

**Univerzita Pardubice**  
**Fakulta chemicko-technologická**

**Výskyt akrylamidu v potravinách a možnosti jeho analýzy**

**Nikola Kopecká**

**Bakalářská práce**  
**2019**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Nikola Kopecká**  
Osobní číslo: **C16187**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Název tématu: **Výskyt akrylamidu v potravinách a možnosti jeho analýzy**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování:

1. V úvodu bakalářské práce charakterizujte akrylamid jako chemickou sloučeninu. Popište, o jakou látku se jedná, jak vzniká a jaké jsou její toxikologické účinky na lidský organismus.
2. Nastudujte problematiku expozice akrylamidu a zjistěte, které potraviny k ní přispívají. Vypracujte přehled potravin, ve kterých se akrylamid může vyskytovat.
3. Zabývejte se analýzou akrylamidu v potravinách, případně v biologických maticích. Vyhledejte v odborné literatuře studie, které se věnují analýze této látky, a popište metody stanovení včetně úpravy vzorku před vlastní analýzou.

---

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Blanka Švecová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandeř, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. 6. 2019

Nikola Kopecká

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce paní Ing. Blance Švecové, Ph.D. za odborné konzultace, poskytnuté materiály, trpělivost a pomoc při vedení mé bakalářské práce. Také děkuji rodině a blízkým přátelům za podporu během doby mého studia.

## **Anotace**

Tato bakalářská práce je zaměřena na sloučeninu akrylamid, jeho vliv na lidské zdraví a jsou popsány možné způsoby jeho analýzy. Nejprve je uvedena základní charakteristika, vlastnosti akrylamidu a jeho nejčastější výskyt v potravinách. V další části je popsán metabolismus akrylamidu a jeho vliv na zdraví zvířat a lidí a také potencionální rizika spojená s dlouhodobou expozicí. Dále je pozornost věnována samotné analýze akrylamidu pomocí moderních instrumentálních technik jako např. chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií nebo pomocí biosenzorů.

## **Klíčová slova:**

Akrylamid, toxicita, glycidamid, biotransformace, DART-HRMS, biosenzory

## **Title**

Occurrence of acrylamide in food and the possibilities of its analysis

## **Annotation**

This bachelor thesis is focused on the compound acrylamide, its influence on human health and possible ways of its analysis are described. Firstly, the basic characteristics, properties of acrylamide and the most frequent occurrence in food are presented. The next part describes acrylamide metabolism and its influence on animal and human health as well as potential risks associated with long-term exposure. Furthermore, attention is paid to the analysis of acrylamide using modern instrumental techniques such as chromatography in combination with mass spectrometry or using biosensors.

## **Keywords:**

Acrylamide, toxicity, glycidamide, biotransformation, DART-HRMS, biosensors

# Obsah

Seznam obrázků.....	9
Úvod.....	10
1. Charakteristika a vlastnosti akrylamidu.....	11
2. Akrylamid v potravinách .....	13
2.1. Akrylamid ve smažených bramborových produktech.....	13
2.2. Akrylamid v pekařských výrobcích .....	13
2.3. Akrylamid v kávě, náhražkách kávy a v čaji .....	14
2.4. Akrylamid v dalších komoditách .....	15
2.5. Akrylamid v povrchové a pitné vodě.....	16
3. Světové trendy ve výskytu akrylamidu v potravinách.....	17
3.1. Soubor opatření „Akrylamid Toolbox“.....	17
3.2. Evropské trendy a změny v obsahu akrylamidu .....	19
4. Mechanismy tvorby akrylamidu .....	22
4.1. Tepelné zpracování potravin a Maillardovy reakce.....	22
4.2. Hlavní cesty vzniku akrylamidu.....	23
4.3. Minoritní cesty vzniku akrylamidu .....	25
5. Příjem akrylamidu a jeho účinky .....	26
5.1. Akrylamid v těle.....	26
5.2. Expozice akrylamidu a jeho příjem stravou.....	26
5.3. Toxikologické účinky v tkáních.....	27
5.4. Karcinogeničita u zvířat .....	27
5.5. In vitro a in vivo genotoxicita .....	27
5.6. Studie karcinogenních účinků akrylamidu na člověka.....	28
6. Akrylamid a účinky na potomstvo.....	29
6.1. Vliv akrylamidu na centrální nervový systém .....	30

6.2.	Vliv akrylamidu na rozmnožovací systém.....	31
7.	Metabolismus akrylamidu v lidském těle .....	32
7.1.	Absorpce a biologická dostupnost .....	32
7.2.	Biotransformace .....	32
7.3.	Biomarkery expozice akrylamidu .....	34
8.	Analýza akrylamidu v potravinách .....	36
8.1.	Odběr vzorků a homogenizace.....	36
8.2.	Izolace akrylamidu z matrice potravin.....	36
8.3.	Čištění extraktu .....	37
8.4.	Derivatizace.....	38
8.5.	Analýza pomocí plynové chromatografie .....	38
8.6.	Analýza pomocí kapalinové chromatografie .....	39
8.7.	Kvantifikace akrylamidu v potravinách pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS).....	40
8.8.	DART-HRMS .....	40
8.9.	Analýza akrylamidu pomocí biosenzorů.....	40
8.9.1.	Základní koncepce biosenzoru.....	41
8.9.2.	Amperometrické akrylamidové biosenzory .....	41
8.9.3.	Potenciometrické akrylamidové biosenzory .....	42
8.10.	Stanovení akrylamidu pomocí imunoenzymatických testů .....	42
8.11.	Obsah akrylamidu v potravinách: predikce a kvantifikace .....	44
	Závěr .....	45
	Zdroje.....	47



## Seznam obrázků

Obr.1: Strukturní vzorec akrylamidu .....	11
Obr.2: Faktory ovlivňující tvorbu akrylamidu u pekárenských výrobků .....	14
Obr.3: Sloupcový diagram hladin akrylamidu v potravinách.....	19
Obr.4: Procentní podíly výsledků z jednotlivých kategorií potravinových výrobků z let 2007 až 2010 .....	20
Obr.5: Mechanismus tvorby akrylamidu .....	24
Obr.6: Strukturní vzorec glycidamidu .....	26
Obr.7: Vliv akrylamidu na organogenezi a postnatální vývoj .....	30
Obr.8: Schéma absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování akrylamidu .....	33
Obr.9: Hlavní cesty biotransformace akrylamidu.....	33
Obr.10: Derivatizace akrylamidu s kyselinou 2-merkaptobenzoovou.....	38
Obr.11: Derivatizace akrylamidu (bromace) .....	38
Obr.12: Schéma metody přímá ELISA.....	43

## Úvod

Je tomu už dávno, kdy člověk objevil oheň. Oheň, bez kterého se dnes již nejspíš nikdo neobejde. Vaření je již dávnověkou praxí, díky které se nejen zvyšuje kvalita některých potravin, ale také mikrobiologická bezpečnost. Teplo je důvodem všemožných chemických změn a vzniku nepřeberného množství nových molekul, z nichž některé mají pozitivní účinky na zdraví. Na druhou stranu, tepelná úprava nemusí mít jen kladné dopady. Některé sloučeniny mohou mít karcinogenní a v některých případech i mutagenní vlastnosti. V posledních desetiletích získávají výzkumníci vhled do pochopení potencionálního rizika pro veřejné zdraví, jež představují sloučeniny vznikající během vaření a tepelného zpracování různých potravin. Jedním příkladem za vše je objev akrylamidu ve vařených potravinách bohatých na sacharidy, který byl představen ve Švédsku. Ten vyvolal mnoho obav a zároveň intenzivní vědecké studie týkající se výskytu, analýzy, expozice, toxikologie sloučeniny, mechanismů tvorby a možná opatření při kontrole. Potraviny bohaté na sacharidy a asparagin mají celkově vyšší potenciál tvořit akrylamid. Ten se tudíž nachází ve všech těchto potravinách, které jsou poté vystaveny vyšší teplotě. Pro představu mezi ně patří pečivo, hranolky, snídaně cereálie a třeba také káva. Vyskytuje se také u neohříváných potravin, jako jsou sušené švestky nebo černé olivy.

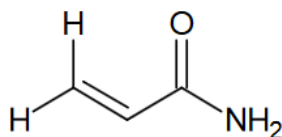
Expozice akrylamidu je různá v závislosti na způsobu zpracování a přípravy, ale také na stravovacích návycích obyvatelstva. Tato skutečnost nemálo otřásla důvěrou spotřebitelů ohledně bezpečnosti produktů. Mechanismy vzniku akrylamidu jsou však z větší části neznámé, je proto důležitý hlubší výzkum pro lepší pochopení mechanismů samotných, jakožto i faktorů ovlivňující tvorbu toxických látek v potravinách. Je tedy jasné, že snižování hladiny akrylamidu v tepelně upravených potravinách je jedním z hlavních cílů pro agropotravinářský průmysl.

Cílem této práce je přiblížit problematiku expozice akrylamidu a na základě dostupné literatury popsat jeho biotransformaci a možný vliv na lidské zdraví. Dále také popsat výskyt akrylamidu v potravinách a nastínit metodiku jeho analýzy.

## 1. Charakteristika a vlastnosti akrylamidu

Jak již bylo řečeno, tepelné zpracování potravin je důležité především pro zlepšení mikrobiologické bezpečnosti, zvýšení kvality potravin (tudíž i výživy), jejich uchovávání a dále snížení úrovně potenciálně toxických látek pro náš organismus. Tato úprava je dále důležitým prostředkem pro konzervaci a pro určení organoleptických vlastností jako struktury a chuti ve smažených, pražených i pečených produktech. Teplo vyvolává chemickou změnu v potravinách a vytváří se mnoho nových molekul, z nichž některé jsou příznivé pro naše zdraví. Dále vznikají sensorické látky, jako je specifická vůně a chuť. Kromě těchto bezpochyby kladných přínosů s sebou tepelná úprava přináší i negativní dopady. Tepelná úprava může vést k tvorbě toxických sloučenin. Jde o látky heterocyklické, tedy aminy, akrylamid, furan, furfuraly a chlorpropanoly. Všechny tyto sloučeniny vykazují karcinogenní a místy i mutagenní vlastnosti. Proto samotný akrylamid byl v roce 1994 klasifikován Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) jako "karcinogen skupiny 2 A".

Akrylamid (prop-2-enamid,  $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) je vinylový polymer, který se využívá jako průmyslová chemikálie. Akrylamid je bezbarvá, nízkomolekulární látka bez zápachu. Je stabilní za laboratorní teploty a sublimuje pouze pozvolna. Je vysoce rozpustný ve vodě, dále v methanolu a ethanolu a také ochotně v acetonu. Akrylamid je látka krystalická vykazující reaktivitu a má schopnost řetězit se za vzniku polyakrylamidu. Polymerizuje právě při zahřátí na teplotu tání (viz tabulka 1) nebo pokud je vystaven UV záření. Tato reakce je exotermní a probíhá velmi rychle. Pokud je vystaven vysokým teplotám, uvolňují se z něho oxidy dusíku za doprovodu štiplavého kouře. Akrylamid je monomer se dvěma funkčními skupinami. Obsahuje amidickou skupinu a dvojnou vazbu, která je zodpovědná za zmíněnou reaktivitu. Nevykazuje fluorescenci a má jen slabé acidobazické vlastnosti. Nelze ho detekovat pomocí UV, jelikož neobsahuje silný chromofor. [1,2]



Obr.1: Strukturální vzorec akrylamidu [1]

Polyakrylamid jako takový toxicitu nevykazuje, avšak může kvůli nedokonalé polymerizaci často obsahovat neopolymerizovaný akrylamid, který naopak toxický je. Spektrum využití polyakrylamidu je široké. Používá se jako flokulant při čištění odpadní i pitné vody,

pro zpevnění půdy při stavění silnic, jako aditivum při výrobě kosmetických produktů nebo jako pojivo v papírenském průmyslu. Dále také pro výrobu barviv, kontaktních čoček a při rafinaci cukru. Využívá se také v analytické biochemii při elektroforetické separaci proteinů. [1,2]

Tab.1: Fyzikálně-chemické vlastnosti akrylamidu

<b>Vlastnost</b>	<b>Hodnota</b>
Molekulová hmotnost	71,08
Hustota	1,122 g/ml (při 30°C)
Teplota tání	84,5°C
Teplota varu	
0,27 kPa	87°C
0,67 kPa	103°C
1,4 kPa	116,5°C
3,3 kPa	136°C
Tenze par	0,9 Pa (při 30°C)
Teplota vzplanutí	138°C

## **2. Akrylamid v potravinách**

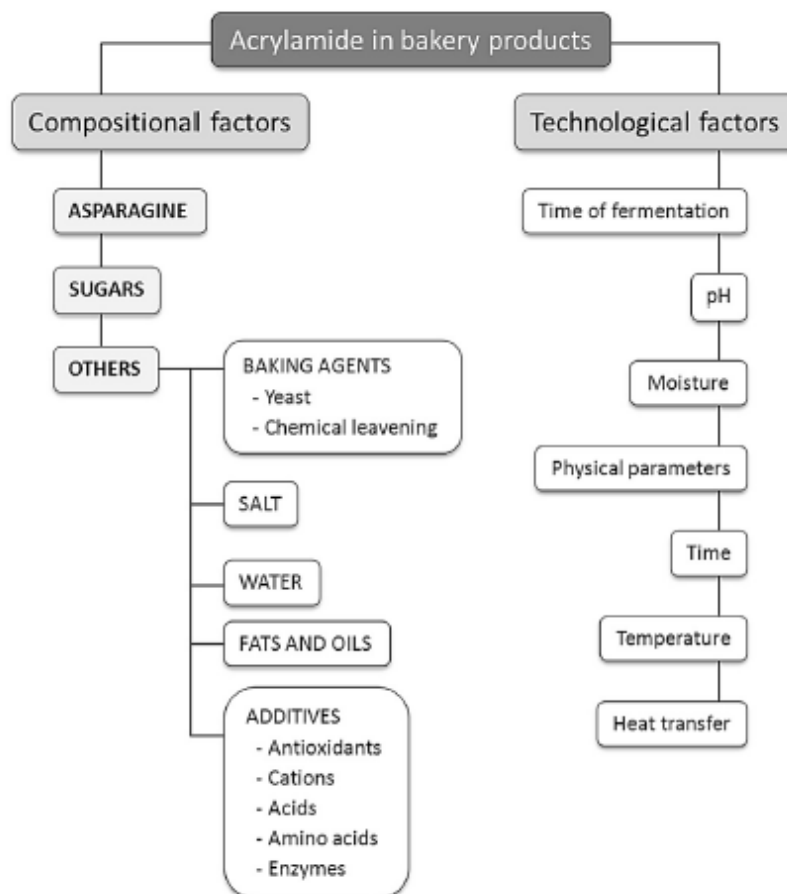
### **2.1. Akrylamid ve smažených bramborových produktech**

Jelikož je komodita smažených bramborových produktů bohatá na redukující cukry a volný asparagin, byly u ní zjištěny vysoké koncentrace akrylamidu. Dalším přítěžujícím faktorem je samotný proces smažení těchto výrobků, stejně tak doba smažení je dalším rizikovým faktorem. Malé odchylky v době smažení mají za následek velké rozdíly v obsahu akrylamidu v hranolkách. Obsah cukrů (glukóza, fruktóza) v bramborách také ovlivňuje výsledné množství akrylamidu. Tyto rozdíly komplikují odhad jeho výskytu. Použitím brambor s nízkým obsahem redukujících cukrů lze jeho obsah snížit, avšak v praxi variabilní smažení tuto snahu komplikuje. Proto by při hodnocení rizika vzniku akrylamidu neměly být ignorovány tyto rizikové faktory. [1-3]

### **2.2. Akrylamid v pekařských výrobcích**

Pro pekařské výrobky je základní složkou obilná mouka a tyto výrobky jsou podrobeny procesu pečení. Pečením je myšlen proces tepelné úpravy, kdy teplo působí přímo na potravinářský výrobek. Teploty při pečení mohou dosahovat až 260 °C. Mezi pekařské výrobky zahrnujeme chléb a pečivo, sušenky, koláče a další produkty jako preclíky, muffiny nebo vafle. Všechny tyto výrobky se samozřejmě liší složením a postupy výroby.

Proces pečení vyvolává řadu chemických reakcí mezi potravinovými komponentami, které mohou vést ke zlepšení texturních i organoleptických vlastností potravin. Tyto reakce probíhají za vysoké teploty a nízké vlhkosti. Na základě toho lze ovlivnit chuť, barvu i vůni výrobků. Oproti těmto bezpochyby kladným důsledkům, může dojít i k tvorbě akrylamidu. Ten se tvoří v pekárenských výrobcích během tepelného procesu v důsledku Maillardových reakcí. V těchto reakcích spolu reagují redukující cukry s aminokyselinou asparaginem, především při teplotách přesahujících 120 °C. Přísady v jednotlivých výrobcích tedy představují zásadní faktory, zda budou prekurzory akrylamidu vznikat ve vyšší nebo nižší míře, zatímco podmínky zpracování budou určovat stupeň vývoje Maillardových reakcí. Dalšími ovlivňujícími faktory je pH, vlhkost, složení potravin a technologické podmínky během pečení. Schéma faktorů ovlivňující tvorbu akrylamidu u pekárenských výrobků je znázorněno na následujícím obrázku. [1,2]



Obr.2: Faktory ovlivňující tvorbu akrylamidu u pekárenských výrobků [3]

### 2.3. Akrylamid v kávě, náhražkách kávy a v čaji

Káva a čaj jsou nejpopulárnější nápoje světa, to především pro jejich atraktivní aroma a chuť, také pro jejich farmaceutický potenciál a zdraví podporující účinky. Právě blahodárné účinky kávy jsou připisovány účinkům kofeinu, jelikož má příznivý vliv na bdělost a kognitivní schopnosti, ale také snižuje riziko onemocnění diabetes mellitus 2. typu a napomáhá zlepšovat stavy související s kardiovaskulárním rizikem. Naopak potencionální rizika spojená s vysokým obsahem kofeinu v lidském těle zahrnují nespavost, palpitaci (bušení srdce) a stejně tak ztrátu kostní hmoty a možné riziko zlomenin. Z tohoto důvodu byly vyvinuty náhražky kávy, tedy produkty bez kofeinu. V současné době jsou nejvíce používané ingredience sladový ječmen nebo pražený kořen čekanky. Kávové náhražky se poté připravují vařením těchto pražených přísad a jejich mletých zrn. Během pražení je matrice vystavena teplotám vyšším než 200 °C. Vysoká teplota je zodpovědná za vyvolání komplexních chemických reakcí, jako jsou Maillardovy reakce a karamelizace. V důsledku toho dojde k důležitým změnám chemických, fyzikálních i sensorických vlastností kávových zrn. Vedle vývoje barvy a chuti, která většinou ovlivňuje, zda je pro naše smysly nápoj přijatelný či nikoliv, často dochází

k dalším, velmi důležitým, ale již smysly nerozeznatelným úpravám. Bylo dokázáno, že káva má silnou antioxidační aktivitu. V poslední době bylo zjištěno, že pražení může indukovat vznik toxických molekul, jako je akrylamid nebo furan. Právě akrylamid je dle průzkumu z roku 2010 v kávě a jejích náhražkách přítomen nejvíce. V mnoha případech je káva hlavním zdrojem akrylamidu pro většinu běžných spotřebitelů kávy. Příjem akrylamidu v souvislosti s kávou závisí na mnoha proměnných, jako je stupeň pražení, druh kávy nebo její skladování. Snížení jeho obsahu v kávě je velmi obtížné, jelikož v současné době neexistují žádné průmyslové zásahy pro jeho zmírnění. Možná příležitost ke snížení hladin akrylamidu v kávě a jejích náhražkách je reprezentována výběrem komerčních směsí s vysokým obsahem odrůdy Arabica, která by měla být pražena do temného stupně a společně s enzymem asparaginázou by mohla tvořit možnost, jak redukce dosáhnout.

Vedle kávy je bezpochyby oblíbeným nápojem čaj. Důvodem vysoké poptávky a využití je jeho žádoucí chuť a obsah bioaktivních látek, které jsou prospěšné pro lidské zdraví. Tyto vlastnosti, stejně jako barva a vůně jsou ovlivněny procesem oxidace a fermentace čajových lístků. Právě v čaji byly zjištěny různé hladiny akrylamidu. Velká variabilita hladin akrylamidu by mohla být přičítána různým faktorům, jako je především druh čaje, variabilita prekurzorů akrylamidu v syrových lístcích a rozdílnosti v procesu zpracování. Procesy zpracování se liší v různých regionech a dramaticky tak ovlivňují obsah akrylamidu. V Číně bylo analyzováno několik vzorků zeleného čaje, čaje oolong, černého, bílého, žlutého čaje a čaje Pu-ehr. Hladiny akrylamidu u všech vzorků byly pod hranici 100 µg/kg, s výjimkou zeleného praženého čaje, kde byl obsah akrylamidu nejvyšší. Nejnižší hladiny byly nalezeny u čaje bílého, žlutého a poté černého. Menší množství obsahovaly také čaje oolong a Pu-erh. [1-3]

#### **2.4. Akrylamid v dalších komoditách**

Jak již bylo zmíněno, tepelné procesy mají velký dopad na konečnou kvalitu potravin. Tedy nejen kvalitu nutriční, ale i smyslovou a funkční. Vznikat však může akrylamid, který nalezneme ve větší koncentraci v chlebu, kávě či hranolkách. V menší, ale podstatné míře (až 10 % celkového příjmu), se nachází v jiných potravinách jako jsou sójové výrobky, pražené oříšky či sušené ovoce. Významné rozdíly v koncentraci akrylamidu v sójových produktech způsobují především rozdílné podmínky, jako je okolní vlhkost a teplota. Zajímavé je, že fermentované sójové potraviny obsahují akrylamid jen velmi málo. V mandlovém jádře je naopak obsah prekurzorů akrylamidu vysoký, což silně ovlivňuje tvorbu akrylamidu. Stejně tak v pečených lískových oříšcích je této látky málo kvůli nízkému obsahu volného asparaginu

v surovině ořechu. Podobně jsou na tom arašídy. Vzhledem k nižšímu obsahu cukrů mají ve srovnání s jinými ořechy relativně nižší obsah akrylamidu. U sušených švestek je zajímavé, že ačkoli teploty při sušení obvykle nepřesahují 90 °C, mohou i navzdory této skutečnosti obsahovat značné množství akrylamidu. Vyvarovat se potravinám obsahující akrylamid je očividně nemožné, nejvíce slibným nástrojem pro snížení jeho obsahu je kontrola postupů při přípravě tepelně zpracovaných produktů a přidání enzymu asparaginázy.

Překvapivě, přestože se tepelné úpravy nevztahují na žádný z druhů stolních oliv, byly u nich zaznamenány relativně vysoké hladiny akrylamidu. Nejvyšší hladiny byly nalezeny v černých zralých olivách z Kalifornie, které prošly procesem konzervování. U oliv původem z Řecka a Španělska nebyl akrylamid detekován. Zelené zralé olivy v Kalifornii jsou zpracovány způsobem bez oxidace, což dle průzkumu zapříčiní nižší obsah akrylamidu. Akrylamid také vzniká v kalifornských olivách při sterilizaci teplem. Také doba uchování před zpracováním má vliv na jeho tvorbu. Možným řešením redukce obsahu akrylamidu v černých olivách je přidání aminokyseliny sarcosinu. Tato látka nejenže zmírňuje tvorbu akrylamidu, ale také neovlivňuje smyslovou kvalitu oliv. [3-5]

## **2.5. Akrylamid v povrchové a pitné vodě**

Látky jako akrylamid jsou běžně používány pro čiření vody v několika průmyslových oborech, jako je těžba nerostných surovin, v chemickém a potravinářském průmyslu, dále při úpravě odpadních vod a pitné vody. Akrylamid se konkrétně používá k vyšší účinnosti separace pevných látek a kapalin ve vodě, která obsahuje danou suspendovanou látku. Také se používá při výrobě barviv, organických chemikálií, pesticidů, kontaktních čoček, kosmetiky i toaletních potřeb. Vzhledem k používání akrylamidu ve stavebnictví jako chemické injektážní činidlo a stabilizátor půdy pro výstavbu kanalizací, studní a tunelů, se tato látka prostřednictvím půdy dostává do pitné vody. Jelikož se akrylamid neváže na půdu a je vysoce rozpustný ve vodě, může se zvýšit riziko znečištění povrchových a podzemních vod. Evropská rada podle směrnice o pitné vodě také stanovila maximální hladinu akrylamidu na 0,1 µg/l v pitné vodě. [1-3]

Bylo zaznamenáno několik případů otravy z vody kontaminované akrylamidem. Počáteční příznaky zahrnovaly vyrážku na ruce, křeče a pocení. Následně jedinci, kteří byli vystaveni působení akrylamidu, měli bolesti hlavy, trápila je dušnost a svalová slabost, navíc také ztráta rovnováhy a v některých případech došlo až k ataxii, což je porucha koordinace pohybů. Ačkoli reprodukční toxicita byla prokázána pouze ve studiích na zvířatech, vyvstává otázka, zda akrylamid představuje v pitné vodě hrozbu pro lidské zdraví či nikoliv. [3]



### **3. Světové trendy ve výskytu akrylamidu v potravinách**

Přítomnost akrylamidu v potravinách je úřady považována za vážnou krizi související s potravinami. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) akrylamid představuje potenciální zdravotní riziko, neboť za určitých okolností může způsobit poškození tkání nebo rakovinu. Upozornění na skutečnost i na jaké úrovni může vyvolat patologické změny, je prozatím nejisté, stejně jako přesný mechanismus tvorby i kroky potřebné ke snížení jeho koncentrace. Díky rostoucímu povědomí došlo v posledních letech k nárůstu počtu publikací o přítomnosti a tvorbě akrylamidu v různých potravinách, celkovém množství konzumovaném ve stravě a potenciálním riziku na lidské zdraví. Je však nutno tyto poznatky více sumarizovat, jelikož jednotlivé publikace jsou spíše fragmentární. Je proto důležité se soustředit na nejnovější poznatky z výzkumu o mechanismu tvorby, výskytu v potravinách, metodách analýzy a také především hodnocení rizik a účinků na zdraví.

Již od zveřejnění zprávy o přítomnosti akrylamidu v potravinách a jeho negativních důsledcích na lidské zdraví započaly intenzivní studie, jejichž výstupem měly být účinné postupy k redukci jeho obsahu. Po roce 2000 nastala vlna kontrol legislativy ohledně výskytu a obsahu akrylamidu. V roce 2005 Konfederace evropského potravinářského a nápojového průmyslu (FoodDrinkEurope) jako první popsala strategie pro zmírnění tvorby akrylamidu v pokrmech a vydala tzv. "Toolbox", tedy soubor metod souvisejících se snížením hladiny obsahu této škodlivé látky. Cílem všech zpracovaných metodik je vést a podporovat výrobce v náležitých postupech, jak na úrovni základních surovin, tak i dále ve fázích zpracování, ke snižování akrylamidu v konečných produktech. [4]

#### **3.1. Soubor opatření „Akrylamid Toolbox“**

Na základě studií na zvířatech bylo potvrzeno, že akrylamid potenciálně zvyšuje riziko vzniku rakoviny pro spotřebitele všech věkových kategorií. Akrylamid je neurotoxikum u zvířat i lidí a multiorganický karcinogen. U krys a myší bylo provedeno několik testů a všechny vedly k rakovinnému bujení především v mléčných žlázách, ale také na kůži či v plicích. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny zařadila akrylamid do skupiny 2 A (pravděpodobně karcinogenní pro člověka). Existuje tedy oprávněná obava o veřejné zdraví. Ačkoli je prakticky nemožné akrylamid z potravin úplně odstranit, protože asparagin je důležitou aminokyselinou v cyklu skladování dusíku u rostlin, je nutno provést alespoň částečnou redukci expozice. Klíčem k úspěchu by tedy mohla být snaha "oddělit" mechanismus cesty k toxickému akrylamidu z obecných Maillardových cest a zachování požadovaných atributů tepelně

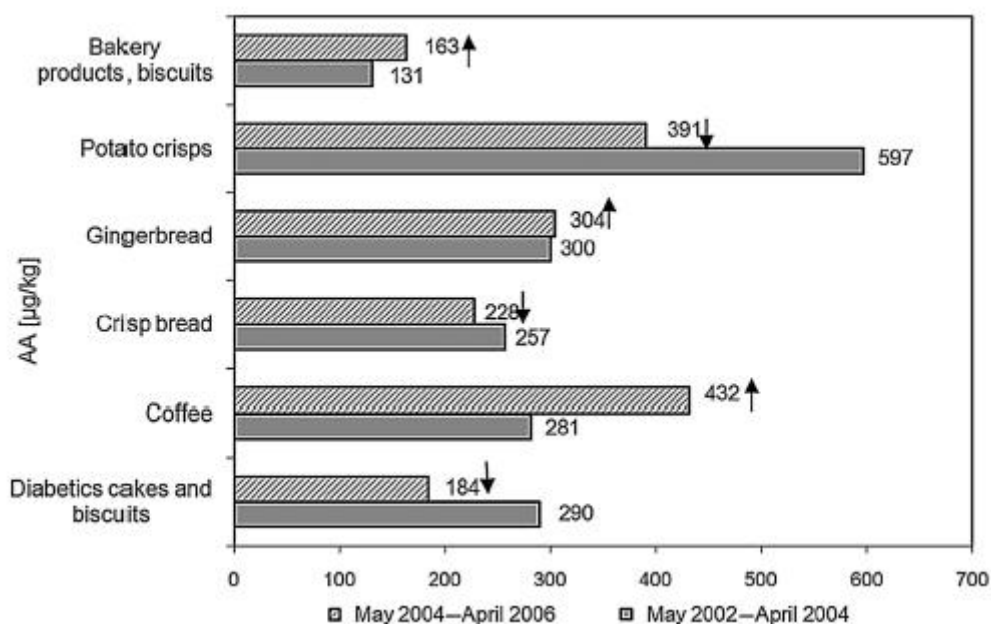
upravených potravin včetně nutričních vlastností a účinků na zdraví. Proto kontrolní orgán FoodDrinkEurope v úzké spolupráci s vnitrostátními orgány a Evropskou komisí vypracoval soubor opatření, tzv. „Acrylamide Toolbox“, ve kterém nastínil cesty ke snížení akrylamidu v potravinách. „Acrylamide Toolbox“ pomáhá výrobcům potravin k identifikaci nejlepších způsobů, jak snížit obsah akrylamidu v jejich produktech, přičemž berou v úvahu nejnovější vědecký a technologický vývoj. V roce 2013 byla zveřejněna oficiální zpráva Evropské unie o novém doporučení, které se týkalo hladin akrylamidu v potravinách a byly stanoveny orientační hodnoty pro širší škálu potravin. V roce 2017 bylo vypracován seznam srovnávacích hodnot pro rizikové potraviny. Hladina akrylamidu v pšeničném chlebu je okolo 50 µg/kg naopak u hranolek k přímé spotřebě je tato hodnota desetkrát vyšší. Pro praženou kávu a její náhražky byla zjištěna hladina do 500 µg/kg, zatímco náhražky kávy výhradně z čekanky dosahují hodnot až 4000 µg/kg.

Toolbox má poskytnout praktické metody, jejichž využíváním mohou výrobci dosáhnout snížení hladiny akrylamidu o 40 – 90 % ve vybraných potravinách. Již změny v komerčních produktech vedly k výraznému zlepšení situace. Obměna receptur a výrobních postupů, použití invertního sirupu s nízkou hladinou fruktózy nebo například nahrazení hydrogenuhličitanu amonného hydrogenuhličitanem sodným, to vše vedlo ke snížení obsahu až o dvě třetiny. V celozrnných a otrubový potravinách se asparagin vyskytuje přirozeně ve vyšším množství, jsou proto předmětem probíhajícího výzkumu. [5]

Komerčně dostupný enzym asparagináza představuje účinnou složku většiny novějších opatření. Některé efektivní metody však nebyly považovány za potenciální cesty, protože byly v přímém rozporu se zdravotními cíli, jelikož náhrada celozrnné mouky nebo otrub rafinovanou moukou je v rozporu s projektem EU „HEALTHGRAIN“, který má snahu naopak zvýšit příjem celozrnných produktů. Dále výměna hydrogenuhličitanu amonného za sodný je v přímém rozporu se Světovou zdravotnickou organizací (WHO) a úsilí EU o snížení hypertenze a srdečních chorob prostřednictvím redukce sodíku ve stravě. Kodex však udává, že sám výrobce musí uvážit bilanci mezi nutričními hodnotami a minimalizací akrylamidu. Do budoucna s pomocí nových technologií mohou být k dispozici nové metody a úpravy těch stávajících. [6]

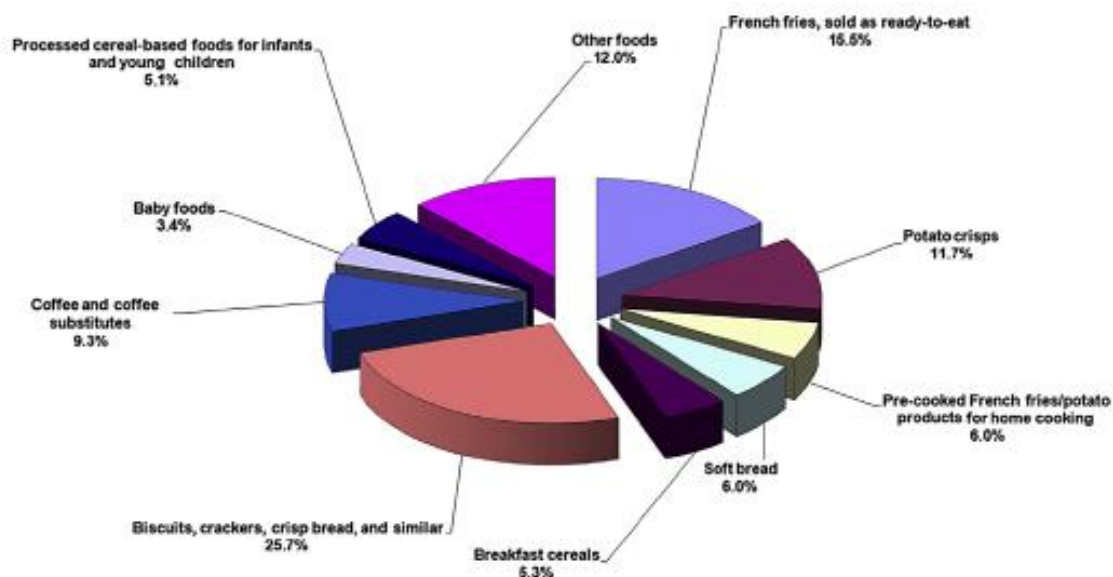
### 3.2. Evropské trendy a změny v obsahu akrylamidu

Při analýze výsledků shromážděných mezi lety 2002 a 2006, Wenzl a Anklam usoudili, že došlo k poklesu akrylamidu ve třech kategoriích produktů: bramborových lupínků, chleba a sušenek. Nadlimitní hladiny byly zaznamenány u kávy, pekárenských výrobků a sušenek. Na následujícím schématu šipky naznačují pokles a nárůst hladin. [7]



Obr.3: Sloupcový diagram hladin akrylamidu v potravinách [6]

V letech 2007 až 2010 byl pozorován "společný evropský trend" v poklesu hladin akrylamidu pouze v jedné z deseti vyšetřovaných kategorií potravin. Tato skutečnost je znepokojující a může to poukazovat na nedostatky či neúčinnost opatření, které by výrobci měli přebírat v rámci různých fází zpracování potravin, aby byla dostatečně snížena hladina akrylamidu v konečném produktu. Úřad EFSA (European Food Safety Authority, Evropský úřad pro bezpečnost potravin) navrhuje, aby se každý rok prozkoumal určitý počet vzorků z každé kategorie potravin, kvalifikovat je do správných kategorií, správně je analyzovat a dokumentovat použitou analytickou metodu. Následující obrázek představuje zastoupení akrylamidu v jednotlivých skupinách potravin v letech 2007 až 2010 vyhodnocené úřadem EFSA. [6,8]



Obr.4: Procentní podíly výsledků z jednotlivých kategorií potravinových výrobků z let 2007 až 2010 [6]

Powers a kol. zpracovali nejpočetnější databázi výsledků hladin akrylamidu v bramborových lupíncích. Na zveřejněných výsledcích se podíleli výrobci z 20 evropských zemí a shromážděné vzorky, kterých bylo více než 40 000, byly homogenní, jelikož pro výzkum se většinou využívaly brambory čerstvé. Autoři studie ukázali jasné snížení hladiny akrylamidu v lupíncích v letech 2002 až 2011, což naznačuje, že „Akrylamid Toolbox“ byl účinný. Je důležité upozornit na objektivitu tohoto výzkumu, neboť byl prováděn během dlouhého pozorovacího období a byl prováděn na obrovském množství vzorků. [9]

V roce 2004 byl zaveden výzkum zaměřený na hladiny akrylamidu v potravinách v Polsku. Testovaný materiál byl vybrán náhodně v určených obchodech po celém státě a zahrnoval 24 vzorků bramborových lupínek. Monitorovací výzkum, který poté probíhal v následujících letech, zahrnoval i další čtyři kategorie, konkrétně hranolky připravené k jídlu, předvařené hranolky, snídaňové cereálie (kukuřičné vločky) a pekařské výrobky (sušenky). Všechny vzorky byly odebrány mezi roky 2007 a 2009 z doporučení Komise EU. Reprezentativnost výsledků zaručilo nejen náhodné shromáždění vzorků pro výzkum po celé zemi, ale také podrobné informace o místě, podmínkách vzorkování, složení surovin, výrobci a tepelném zpracování. Redukce obsahu akrylamidu byla prokázána pouze u předvařených hranolek.

Posouzením celkových evropských trendů hladin akrylamidu v potravinách dojdeme k závěru, že ve skupinách potravin neexistuje žádný konstantní trend. Trend klesajícího obsahu v jednom druhu potravin byl pozorován v době, kdy obsah akrylamidu v jiných potravinách stoupal.

U jednotlivých vzorků se stále akrylamid vyskytuje ve vysokém množství. Snížení obsahu akrylamidu bylo dosaženo v oblasti bramborových produktů. Zjištěná tendence změn hladiny akrylamidu v potravinách může být důsledkem neúčinnosti navrhovaných změn při zpracování potravin nebo změny nejsou plně implementovány výrobcí. [6]

Nejnižší hladiny akrylamidu byly stanoveny v těchto dvou kategoriích potravin: "Zpracované potraviny na bázi obilovin pro kojence a malé děti " (nejsou zařazeny sušenky a suchary) a "Dětské potraviny, jiné než potraviny zpracované na bázi obilovin" (nejsou zařazeny sušené švestky). Tato hodnota byla 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Dále byly stanoveny orientační hodnoty pro kategorii "Kávové náhražky", která byla rozdělena na "kávové náhražky převážně založené na obilovinách" (orientační hodnota 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) a "ostatní náhražky kávy" (stanovená orientační hodnota 4000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Orientační hodnoty v jiných pokrmech jsou v rozmezí 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ("pšeničný měkký chléb ") na 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ("bramborové lupínky"). Důležité je mít však na paměti, že orientační hodnoty nejsou maximální povolené hladiny akrylamidu v potravinách. [6]

Vyhláška Ministerstva Vnitřní věci o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmy (38/2001 Sb.) upravuje nejvyšší povolené množství akrylamidu migrujícího z obalových materiálů do potravin na hodnotu 0,01  $\text{mg}/\text{kg}$ . Pokud je akrylamid přítomný v pitné vodě, je jeho limitní hodnota 0,1  $\mu\text{g}$  na litr pitné vody. [1]

## 4. Mechanismy tvorby akrylamidu

Od objevu akrylamidu v některých potravinách bylo nutné provést identifikaci molekulových prekurzorů a objasnit reakční mechanismus, který ke vzniku akrylamidu vede. Již víme, že hlavní hnací silou tvorby akrylamidu jsou Maillardovy reakce, tedy reakce mezi redukcujícími sacharidy (glukózou nebo fruktózou) a přirozeně přítomnými aminokyselinami (především asparaginem), když se potraviny zahřívají. To vše vede k požadované chuti a barvě pokrmů, které jsou vystaveny pečení či smažení. 3-aminopropanamid (3-APA), biogenní amin, vytvořený během Maillardových reakcí, může být jedním z klíčových prekurzorů akrylamidu. [10]

### 4.1. Tepelné zpracování potravin a Maillardovy reakce

Tepelný proces vyvolává mnoho reakcí, které mohou vést ke snížení nutriční kvality a vzniku nebezpečných látek a tvorbě tzv. „AGE“ produktů (konečné produkty glykace). Tyto látky mohou být akumulovány v krevním řečišti a v tkáňových proteinech a dále se přeměňovat a způsobovat tak různé následky v lidském těle. Procesy Maillardových reakcí in vivo jsou částečně zodpovědné za obecný proces stárnutí. „AGE“ produkty mohou být zodpovědné za pokles funkce tkání a orgánů s věkem, mohou být spojeny s chronickými i degenerativními chorobami, jako je diabetes a selhání ledvin, dále také mohou způsobovat i aterosklerózu či Alzheimerovu a Parkinsonovu chorobu. [11]

Hlavní cestou tvorby akrylamidu jsou Maillardovy reakce spojené zejména s aminokyselinou asparaginem. Rychlost tvorby akrylamidu v potravinách ovlivňuje počáteční koncentrace prekurzorů a teplota zpracování. Při tepelné úpravě potravin dochází k odpařování vody, která je důležitou bariérou pro zvýšení vnitřní energie a limituje množství vytvořeného akrylamidu. Větší energetický obsah v jídle při vyšší teplotě způsobuje rychlejší odpařování vody a tím se zvýší tvorba akrylamidu. [3]

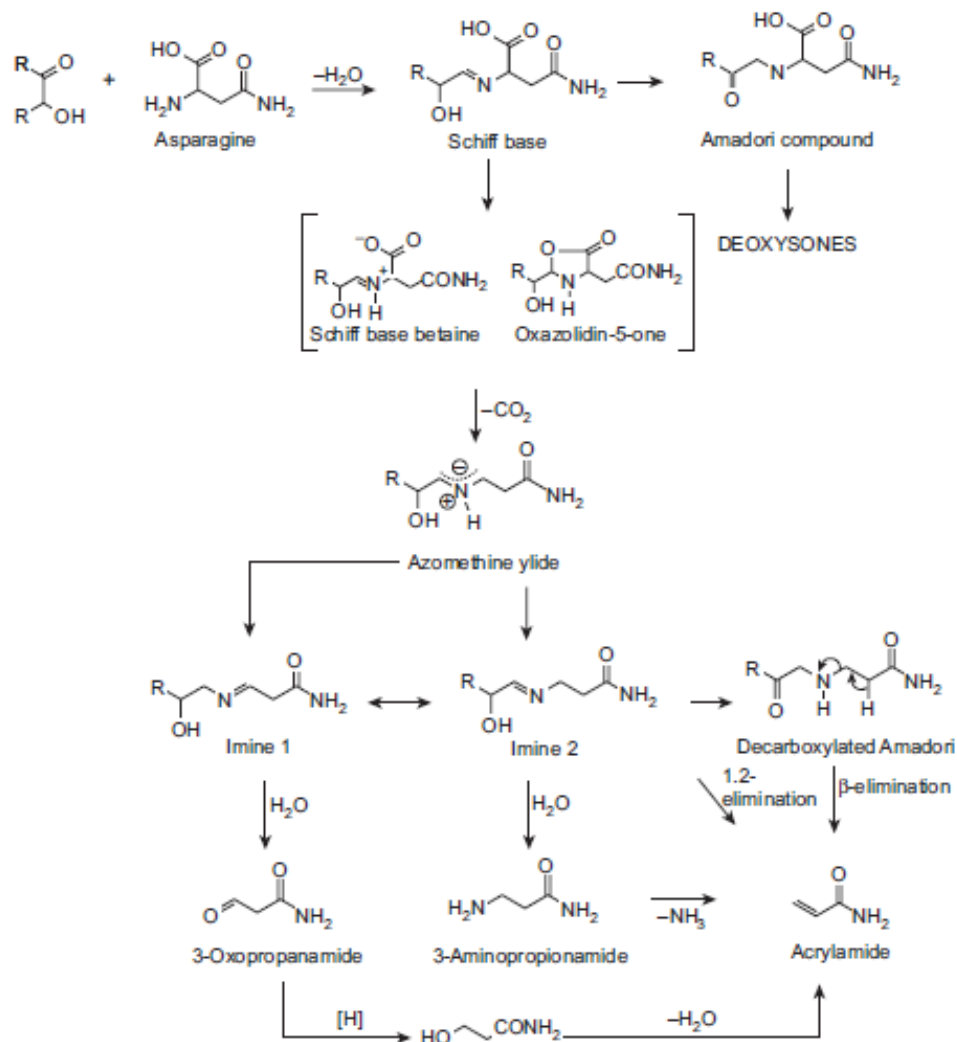
Teplota během ohřevu vzrůstá mnohem rychleji na povrchu než ve vnitřních částech potravin. Povrch potravin je tedy rizikovější z pohledu chemických reakcí vedoucích k nežádoucím toxickým látkám. Dokazuje to skutečnost, že tvorba akrylamidu se odehrává především na samotném povrchu a částech jemu blízkým. Mezi povrchem a vnitřními částmi je tedy velký rozdíl koncentrací akrylamidu. Pro vyhodnocení rizik je proto velmi užitečné určení vztahu mezi časem a teplotou. [12]

Cest, které vedou k tvorbě kontaminujících látek v potravinách, je mnoho. Těchto cest se účastní především lipidy a sacharidy, také bílkoviny s aminokyselinami jako prekurzory nebo bez nich. Tyto cesty jsou vzájemně propojeny a jsou závislé na složení potravin i podmínkách jejich zpracování. Hlavním zdrojem důležitých sensoricky aktivních sloučenin, které vznikají mezi redukujícími sacharidy a volnými aminoskupinami proteinů či aminokyselin, jsou Maillardovy reakce. Během těchto reakcí dochází k vývoji neenzymového hnědnutí potravin, výrobkům je dodávána i jedinečná chuť. Některými nežádoucími důsledky reakcí však může být ztráta živin a tvorba toxických sloučenin, jako je akrylamid. [13,14]

#### **4.2. Hlavní cesty vzniku akrylamidu**

Několik experimentů založených na směsích karbonylů a hydroxykarbonylů nám dává vhled do možností reakčních mechanismů tvorby akrylamidu. Dřívější studie poskytly užitečné informace, že jak karbonylové, tak hydroxykarbonylové skupiny rychle reagují s asparaginem za vzniku akrylamidu. Dále bylo zkoumáno, jaký vliv má pH, teplota, vlhkost a další reakční složky. Zda je cesta pro vznik akrylamidu optimální závisí právě na těchto faktorech. Přibližně stejné množství akrylamidu se vytvoří, když je přidán asparagin k fruktóze či glukóze. Nicméně se zdá, že se vytvoří nižší množství ve směsi glukózy než ve fruktóze. Důvodem může být nižší bod tání fruktózy a také následně rychlejší interakce prekurzorů, které dále mohou poskytnout meziprodukty Maillardových reakcí. Fruktóza tvoří Schiffovu bázi, která stabilizuje vazbu vodíkových můstků v azomethinium-ylidu. Tato dostačující stabilizace může zvýšit rychlost tvorby akrylamidu oproti cestě přes glukózu. Celulóza a pentózy mohou také přispět k jeho tvorbě, pokud je necháme inkubovat společně s asparaginem. Dalšími reakčními složkami mohou být například propanal či glyoxal. Nejvyšší výtěžek akrylamidu však poskytují směsi z 2-hydroxy-1-butanalu, jelikož se rychle tautomerizuje na 1-hydroxy-2-keeton. [15]

Na následujícím obrázku je znázorněn mechanismus tvorby akrylamidu s uplatněním sloučeniny 3-aminopropanamidu (3-APA). [10]



Obr.5: Mechanismus tvorby akrylamidu [15]

Struktura výchozí karbonylové sloučeniny má vliv na výtěžky akrylamidu, a to především funkční skupina v poloze beta (k dusíku). Asparagin reaguje s karbonylovou sloučeninou za vzniku Schiffovy báze, ze které dále vzniká azomethin ylid, který může dát vzniku iminu 1 či iminu 2 (viz obrázek). Hydratací iminu 1 vzniká 3-oxopropanamid, který může reagovat s alkoholem a po dehydrataci vzniká akrylamid. Imid 2 musí být také nejprve hydratován, poté vzniká 3-APA. Deaminací se odštěpí amoniak a vzniká akrylamid. Z iminu 2 může akrylamid vzniknout i přímo. Deaminací 3-APA vzniká velké množství akrylamidu. Výrobky jako je popcorn a pražené kakao byly zařazeny do studie potravin s nejvyšším množstvím 3-APA. Také bylo zjištěno významně vyšší množství 3-APA v bramborách. Poukazuje to na aktivitu specifického enzymu dekarboxylázy v uložených bramborách. [14]



Maillardovy reakce začínají tvorbou reakčních produktů, které vznikly reakcí redukujících cukrů s aminokyselinami. Tyto produkty se nazývají „Amadori“. Z dekarboxylovaných Amadori sloučenin pak vzniká akrylamid přímo. Amadori sloučeniny se v reakční kaskádě přeměňují a rozkládají a vytvářejí tak specifickou barvu a chuť pokrmů. [10,15]

### **4.3. Minoritní cesty vzniku akrylamidu**

Je známo, že asparagin je nejúčinnějším prekurzorem akrylamidu. Jeho klíčová role byla prokázána přidáním enzymu asparaginázy, který katalyzuje hydrolýzu aminové skupiny asparaginu. Ukázalo se, že asparagináza je vysoce užitečná ke snížení vzniku akrylamidu (někdy až o 95 %), jelikož může rozložit aminoskupinu asparaginu a poté již reakce není schopna proběhnout. Asparagin však není jediným zdrojem akrylamidu, jsou to také proteiny/peptidy. Za daných podmínek se může pšeničný lepek rozštěpit při pečení nebo pražení a uvolnit tak akrylamid. Předpokladem pro uvolnění akrylamidu je  $\beta$ -proton v aminokyselině sousedící s alaninem. Proto peptidy nesoucí alanin mohou mít vliv na vznik akrylamidu. [15,16]

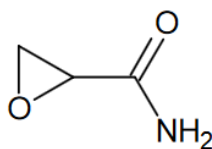
Během výzkumu vzniku akrylamidu bylo nutné odhalit klíčové faktory, které mohou ovlivnit jeho tvorbu v potravinách. Ve většině případů může být dosaženo úspěchu snížením obsahu asparaginu nebo cukrů v potravinách. Skladovací a povětrnostní podmínky, a také odrůdy plodin mají vliv na množství asparaginu. Je zajímavé, že u některých potravin se sníží množství potenciálně vzniklého akrylamidu teplotou přes 180 °C (jako je pražená káva). Byl také proveden experiment s pečivem, ke kterému byl přidán lepek v různých koncentracích. Množství akrylamidu se zvyšovalo s vyšším množstvím přidaného lepku do těsta. [15]

## 5. Příjem akrylamidu a jeho účinky

Lidská expozice akrylamidu je v dnešní době rozšířenější než kdy dříve. Lidé mohou být vystaveni působení akrylamidu ze stravy, z pití, kouřením i pasivním kouřením. Tato látka je také používána v mnohých průmyslových procesech (např. při čištění pitné a odpadní vody nebo při výrobě papíru). Navíc jsou zdroje akrylamidu závislé na národních zvycích. V USA se hojně konzumují hranolky a jiné bramborové produkty, na jihu Evropy může být akrylamid přijímán v chlebu. Studie prováděné na zvířatech prokázaly, že akrylamid je multiorganický karcinogen u hlodavců. [17,18] Samotný účinek této látky spočívá v metabolické přeměně na reaktivní glycidamid, ten tak hraje v genotoxicitě akrylamidu velkou roli, připojuje se totiž k DNA. Obě tyto nežádoucí látky také reagují snadno s množstvím biomolekul včetně hemoglobinu. [19]

### 5.1. Akrylamid v těle

V lidském těle se akrylamid metabolizuje pomocí enzymu cytochromu P450 (CYP2E1) na glycidamid. Dále je snadno absorbován a distribuován do všech tkání. Jak akrylamid, tak i glycidamid se vylučují v moči jako kyselina merkapturová. Glycidamid je ovšem mnohem reaktivnější s DNA, a tudíž metabolismus akrylamidu na glycidamid je předpokládaným krokem genotoxicity akrylamidu. Genotoxické karcinogeny jsou elektrofilní látky, které přímo ovlivňují DNA prostřednictvím tvorby kovalentních vazeb. To vede k tvorbě aduktů, které mohou být důvodem poškození DNA, a pokud není chyba opravena, může dojít až k mutacím a vzniku nádoru. [1]



Obr.6: Strukturní vzorec glycidamidu [1]

### 5.2. Expozice akrylamidu a jeho příjem stravou

Akrylamid se rychle vstřebává kůží a sliznicí, při vdechování a při orálním užívání je dobře absorbován i distribuován do tkání. Po přeměně na glycidamid může být karcinogenní. [17] Po vstupu akrylamidu do těla dochází k absorpci a následnému vyloučení močí. Doba eliminace z lidského těla je do 3,5 hodiny. V játrech vytváří konjugaci s glutathionem (GSH) kyselinu merkapturovou, která je dále připravená k vyloučení. Epoxidace akrylamidu enzymem

CYP2E1 (cytochrom P450 2E1) je cesta ke vzniku glycidamidu, který má po navázání na DNA mutagenní účinky. Glycidamid pak prochází další biotransformací (hydrolyzou) za vzniku glyceramidu. Je opět možná cesta přes konjugaci GSH a vyloučení kyseliny merkapturové močí. Je tedy zřejmé, že akrylamid se v těle nehromadí. [19]

### **5.3. Toxikologické účinky v tkáních**

V mnoha studiích byly prokázány toxikologické účinky akrylamidu v tkáních. Při výzkumu byly krysám podávány různé dávky 5-60 mg/kg/den po dobu 5 dní. Tyto dávky byly podávány perorální cestou. Posléze byly zaznamenány morfologické změny testikulární histologie. Tyto změny byly pozorovány především v zárodečných buňkách semenného epitelu. Morfologické defekty a snížená produkce spermií byly pozorovány v závislosti na podané dávce. [20] Intoxikací akrylamidem a jeho metabolity mohou být poškozeny nervy s malým průměrem a může dojít k degeneraci epidermálních nervů kůže. [21]

### **5.4. Karcinogeničita u zvířat**

Dle FAO (Food and Agriculture Organization) i WHO (World Health Organization) byl akrylamid prokázán jako látka, která v těle zvyšuje riziko výskytu benigních i maligních nádorů v některých orgánech jako je štítná žláza, nadledviny nebo obal varlete. Pokusy u myší a potkanů tedy prokázaly, že se jedná o multiorganický karcinogen. Je však důležitým faktem, že nebylo prokázáno zvýšení rizika vzniku rakoviny při nižších dávkách. Naopak při studiích trvajících po dobu dvou let byly prokázány nádory v mozku, míše, děloze, mléčné žláze i varlatech. [22]

### **5.5. In vitro a in vivo genotoxicita**

Akrylamid a glycidamid jsou potencionální mutagenní látky pro zárodečné buňky. Akrylamid může indukovat dědičná poškození na genu a na úrovni chromozomů. Má genotoxický potenciál in vivo na somatické a zárodečné buňky a má silnou afinitu k proteinům spermatu. [23] Další skutečností, kterou je nutno brát v potaz je přítomnost glycidamidu, který je produktem akrylamidu. Je to reaktivní epoxid, který vytváří adukty s DNA. Vystavení spermií či spermatozoidů akrylamidu či jeho epoxidu zvyšuje výskyt mutací. [24]

## **5.6. Studie karcinogenních účinků akrylamidu na člověka**

Řada epidemiologických studií měla zhodnotit možnou asociaci mezi expozicí akrylamidu a rakovinou u lidí. Kontroverzní výsledky vedly k intenzivnějšímu výzkumu skutečného příjmu akrylamidu a klasifikaci osob dle spotřeby této látky. Studie započala v letech 1995-1996. Výsledná studie se skládala z 112 378 žen a během doby sledování (15 let) se vyskytlo 5 676 případů invazivního karcinomu prsu. Látky jako akrylamid indukují zvýšení výskytu rakoviny. Prozatím nebyla zjištěna souvislost mezi rakovinou slinivky břišní a expozicí akrylamidu. [25]

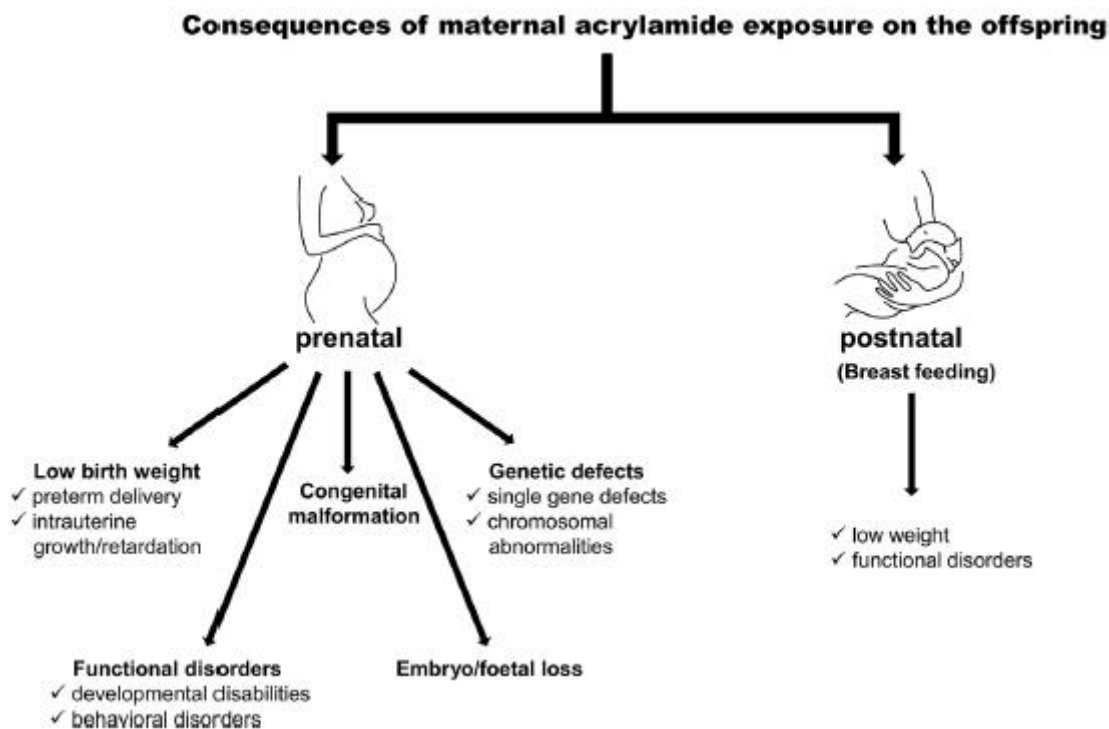
Byl vyhodnocen příjem akrylamidu ze stravy a do výzkumu bylo začleněných 96 druhů potravin. K příjmu akrylamidu nejvíce přispívají tyto potraviny: káva (23 %), celozrnný měkký chléb (17 %), celozrnný křupavý chléb (8 %), smažené brambory (6 %) a bramborové lupínky (4 %). Během doby výzkumu (11 let) mělo nejvyšší míru přijatého akrylamidu v potravě Dánsko, dále Spojené království a poté Nizozemsko, zatímco Itálie byla na posledním místě. Průměrný celkový příjem populace v EU byl odhadnut na 21 µg/den. [26]

## 6. Akrylamid a účinky na potomstvo

Prenatální vývoj je složen z několika pečlivě načasovaných událostí, které na sebe plynule navazují. Vývojové procesy mohou narušit exogenní toxické látky. Hlavními projevy mohou být různé malformace, retardace růstu, narušení funkčnosti orgánů nebo dokonce úmrtí rozvíjejícího se organismu. Účinky toxické látky mohou způsobit závažná poškození nejen během prenatálního období, ale již z expozice před početím (u jednoho z rodičů) nebo po narození do doby sexuálního dospění. Nejvíce citlivé období pro letální účinky je embryonální vývoj (především od oplodnění do 3. měsíce), jelikož během doby organogeneze (4.-12. týden v embryonálním období) dochází k intenzivní proliferaci buněk a diferenciaci tkání. Během fetálního období (od 12. týdne do narození) se mohou vzniklé strukturální abnormality rozvíjet. V tomto období může dojít ke zpomalení růstu, vývojovému zpoždění či k funkčním poruchám orgánů. Následnou patogenezi a vyvolané změny vývoje významně ovlivňuje dávka a expozice dané toxické látky. [27]

Sekundární expozice vyvíjejících se jedinců je nejčastěji zprostředkována placentárním přenosem nebo přes mateřské mléko. Dávky, které způsobují pro jedince toxicitu, jsou obtížně vyhodnotitelné. Expozice toxické látky na plod nemusí být stejná jako u dítěte, stejně tak u těhotné a kojící matky. Stanovení toxické látky v mateřském mléce a pupeční krvi poskytuje lepší odhad expozice. Je tedy pravděpodobné, že za vznik malformací nebo funkčních změn orgánů může přímé působení toxických látek na plod, stejně tak i nepřímé (matkou zprostředkované), tak i kombinované obě varianty. [28]

Ačkoli údaje o biochemických a morfologických účincích akrylamidu během embryonálního a časného postnatálního vývoje jsou vzácné, prenatální expozice akrylamidu je obzvláště znepokojující. Sorgel a kol. zjistili, že až 50 % akrylamidu u těhotných žen bylo přeneseno přes krev do plodu (nemalé množství bylo obsaženo také v mateřském mléce). Protože akrylamid a jeho metabolit glycidamid je ve vodě rozpustný, snadno tedy procházejí placentou, stejně tak dobře procházejí do mateřského mléka. Je stále více důkazů, že akrylamid v období laktace narušuje organogenezi a další postnatální vývoj potomků (obrázek 7). [29]



Obr.7: Vliv akrylamidu na organogenezi a postnatální vývoj [29]

## 6.1. Vliv akrylamidu na centrální nervový systém

Vývoj centrálního nervového systému (CNS) je velmi složitý. Prenatální i postnatální expozice neurotoxika, jako je právě akrylamid, pravděpodobně může ovlivnit strukturu a funkci vyvíjeného mozku. [30]

Byly zkoumány účinky akrylamidu na vývoj mozečku (cerebellum) a prodloužené míchy (medulla oblongata) a na oxidativní stres u novorozených potkanů. Byl jim podáván akrylamid v dávce 10 mg/kg/den žaludečně u samic od 7. dne březosti (gestace) do narození, dále od 7. dne gestace do 28. dne po porodu. Znaky akrylamidové toxicity byly pozorovány u samic vystavených akrylamidu a po narození potomků a zahrnovaly ataxii (poruchu koordinace pohybů), slabost svalů zadních končetin a nakonec paralýzu. Mláďata trpěla podvýživou a byla bez srsti. Výsledky ukázaly, že podáváním akrylamidu během prenatálního období a období laktace významně vyvolalo zvýšení oxidativního stresu a potlačení antioxidačního obranného systému v mozečku a prodloužené míše potomků. Při této studii bylo prokázáno, že podáním akrylamidu byla zpžděna proliferace a migrace buněk a také diferenciacie na vnější granulórní vrstvě mozečku. [31] Akrylamidová toxicita v prodloužené míše se projevuje rysy jako je pyknóza (poškození buněčného jádra, nevratná kondenzace chromatinu v jádru buňky) a neuronové chromatolýzy (změny cytoplazmy neuronů, to vede k degeneraci neuronů).

Tyto výsledky jasně ukazují, že akrylamid (nebo jeho metabolity) způsobují oxidativní stres a indukují změny ve struktuře mozečku a prosloužené míše u rozvíjejících se potkanů. [32] Tato všechna předložená data nepochybně poukazují na teratogenní účinek na nervový systém mláďat.

## **6.2. Vliv akrylamidu na rozmnožovací systém**

Reprodukční toxicita zahrnuje nepříznivé účinky chemických a fyzikálních činidel na sexuální funkce jedinců, také plodnost jedinců dospělých a vývoj jejich potomků. Působení akrylamidu má v reprodukční toxicitě to úskalí, že pokud je jedinec intoxikován (stačí pouze jeden člen z reprodukčního páru), tak se toxicita dále projeví nepříznivými důsledky na jeho potomstvo. Vedle genetických předpokladů, životního stylu a okolního prostředí, přispívajícím faktorem k neplodnosti obou pohlaví je právě akrylamid. Jelikož byl vyhodnocen jako látka s reprodukční toxicitou v multigeneračních studiích na hlodavcích, je zde důvodné podezření, že má negativní dopad i na reprodukční schopnosti u lidí. Akrylamid podávaný ve vodě či sondou hlodavcům v dávkách větších než 5 mg/kg/den vede ke snížení plodnosti, počtu mláďat a jejich špatnému vývoji. Studie prokázaly akumulaci této látky a jejich metabolitů ve varlatech (testes), nadvarlatech (epididymis) a penisu. Akrylamid způsoboval jejich atrofii, tedy změnu, a to převážně zmenšení. Dále způsoboval snížení počtu spermií a jejich morfologické změny, které vedly ke snížení či dokonce nemožnosti reprodukce. [33]

Dlouhodobá (roční) expozice akrylamidu může vést ke kumulaci, aniž by byly pozorovány morfologické změny na varlatech, ale společně s jeho metabolitem glycidamidem mohou způsobovat nevratné poškození chromozomů ve spermatidech. Akrylamid kumulující se při replikaci ve spermatogonálních buňkách, může být důvodem zhoršení schopnosti potomků produkovat plodné gamety. Související studie poukazují na to, že také indukuje tvorbu aduktů, které mohou vyvolat mutagenní účinky v zárodečných buňkách. [34]

Jelikož prozatím neexistují dostatečné údaje, které by prokázaly účinky akrylamidu na potomky žen, které byly vystaveny prenatální expozici, je pro určení toxicity důležitým parametrem vyhodnocení vaječnicků novorozence. Jejich podrobnou morfologickou analýzu však dosud nikdo neprovedl, proto se účinek akrylamidu na ztrátu oogonií, oocytů nebo podpůrných somatických buněk nemůže vyloučit. Kromě toho akrylamid ovlivňuje funkci prsních žláz, to vede ke snížení počtu prolaktinů a tím způsobuje narušení laktace. Tím je způsobena ztráta tělesné hmotnosti potomků a následně jejich podvýživa. [35]

## **7. Metabolismus akrylamidu v lidském těle**

Akrylamid obsahuje dvojnou vazbu a je tedy reaktivní i s biologickými matricemi. Dvojná vazba ochotně reaguje s -SH skupinami v cysteinu je afinní ke skupině -NH<sub>2</sub> v aminokyselinách. Glycidamid také velmi ochotně reaguje díky svému epoxidovému kruhu, a to především s aminoskupinami a bazemi DNA. Biologická dostupnost, metabolismus a využití metabolitů jako biomarkerů expozice jsou velmi důležité součásti výzkumu k odhalení možných zdravotních rizik akrylamidu. [36]

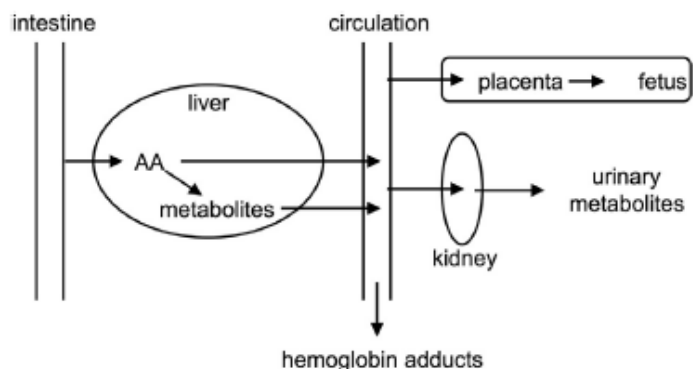
### **7.1. Absorpce a biologická dostupnost**

Perorální biologická dostupnost je definována jako podíl perorálně podávané dávky a množství, které dosáhne systémového oběhu. Akrylamid je vysoce hydrofilní, proto se očekává, že podané dávky budou zcela absorbovány. Řada studií potvrzuje, že orálně podaný akrylamid se rychle absorbuje u hlodavců i lidí. Miller a kol. prokázali, že zhruba 90 % podaného akrylamidu bylo získáno z tkání, tělních tekutin, z moči i stolice. Biologická dostupnost v potravinách je nižší než ve vodě, to je způsobeno interakcemi s nukleofilními skupinami v jídle. Dále je důležité, že biologická dostupnost je značně odlišná mezi živočišnými druhy. Rozpuštěný akrylamid ve vodě byl podáván mužům dobrovolníkům a poté jim byly odebrány vzorky moči. Akrylamid byl velmi rychle absorbován, jelikož první den bylo 51 % dávky získáno v moči ve formě metabolitů. Při pozorování nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly v metabolitech moče. Došlo však k prudkému nárůstu koncentrace akrylamidu v séru. [36]

### **7.2. Biotransformace**

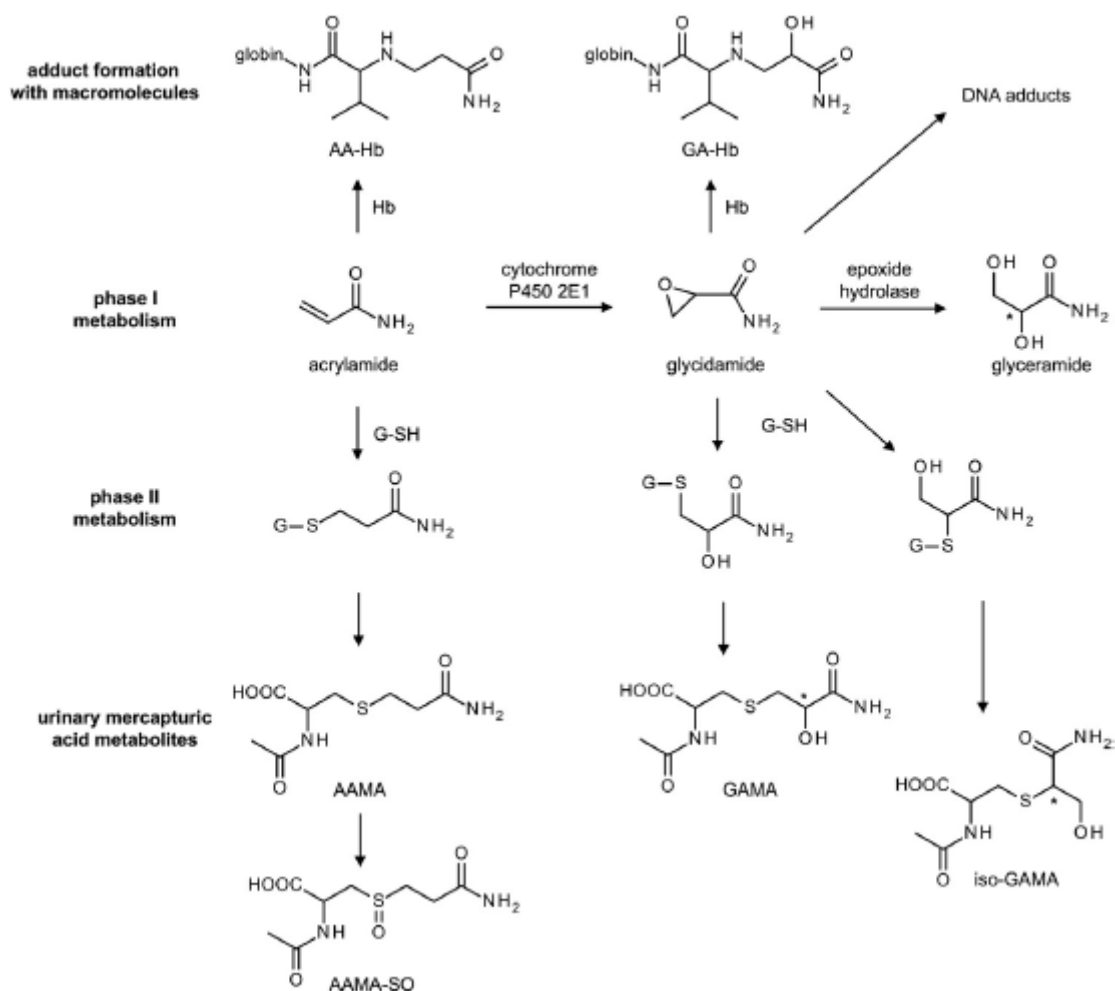
Po konzumaci je akrylamid rychle absorbován a distribuuje se na všechny tkáně pomocí oběhového systému. Schéma jeho absorpce, distribuce, metabolismu i vylučování lze vidět na obrázku č. 8. Dochází k tomu především v placentě, ledvinách, ale také v prsu. Akrylamid je z velké části převeden na metabolity, které se z těla vylučují močí. Může však také interagovat s bílkoviny či DNA a vytvářet tak nechtěné adukty. [1,36]





Obr.8: Schéma absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování akrylamidu [36]

Hlavní cesty biotransformace akrylamidu jsou uvedeny na obrázku č. 9.



Obr.9: Hlavní cesty biotransformace akrylamidu [36]

Akrylamid je elektrofilní sloučeninou s amidovou skupinou a dvojnou vazbou, se kterou ochotně reagují buněčné nukleofily, jako např.  $-SH$  skupina cysteinu, homocysteinu a glutathionu,  $-NH_2$  skupina volných aminokyselin,  $NH$  skupina histidinu a  $N$ -kocových

aminokyselinových zbytků proteinů. In vivo je akrylamid prostřednictvím oxidace cytochromem P450 2E1 částečně převeden na epoxidový glycidamid. Tato reakce probíhá v první fázi metabolismu akrylamidu v lidském těle. Glycidamid je elektrofilní, proto se může kovalentně vázat na buněčné složky. Reakce s aminoskupinou nebo s vodou má za následek otevření kruhu epoxidu. Glycidamid může být také dále hydrolyzován epoxidhydrolázou na glyceramid (2,3-dihydroxypropanamid). V DNA jsou náchylné především nukleofilní dusíky, které mohou tvořit adukty zejména s glycidamidem, to je velký problém vzhledem k jeho genotoxicitě.

Ve druhé fázi metabolismu je požitý akrylamid hlodavci a lidmi konjugován s glutathionem (GSH). Dochází k degradaci a acylaci konjugátu a vzniklá kyselina merkapturonová (AAMA, N-acetyl-S-(2-karbamoylethyl)-L-cystein) je vyloučena močí. Tato konjugace s glutathionem je důležitá pro redukci reaktivity akrylamidu s buněčnými komponentami, díky čemuž je akrylamid méně konvertován na glycidamid. AAMA může být oxidována na svůj odpovídající sulfoxid, avšak pouze u lidí, ne hlodavců. Glutathion může také konjugovat s glycidamidem za vzniku látek GAMA a iso-GAMA. Jsou to konkrétně látky N-acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cysteine (GAMA) a N-acetyl-S-(1-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein (iso-GAMA).

Jak již bylo zmíněno, nukleofilní místa proteinů tvoří s akrylamidem a jeho metabolitem glycidamidem adukty. Albumin a hemoglobin jsou v krvi nejvíce převládajícími bílkovinami, proto akrylamid a glycidamid tvoří právě s těmito látkami adukty nejčastěji.

Látka AA-Hb (N-(2-karbamoylethyl)-valin) a GAHb (N-(2-karbamoylhydroxyethyl)-valin) se tvoří v přítomnosti akrylamidu a glycidamidu s N-terminálními zbytky valinu v hemoglobinu. Tyto dva adukty hemoglobinu přetrvávají v těle déle než ve volných formách a ve formě merkapturických derivátů kyselin. [36]

### **7.3. Biomarkery expozice akrylamidu**

Biomarkery jsou chemické látky, které lze sledovat v těle. Lze tak stanovit expozici, dávku, časté biologické interakce a nepříznivé účinky látek. Biomarkery expozice mohou být exogenní látky a jejich metabolity či produkty interakcí mezi xenobiotickými činidly a cílovými buňkami nebo molekulami organismu. Biomarkery mohou poskytnout informace o expozici osob, biologické dostupnosti a metabolismu, změny úrovně koncentrace v čase, hodnocení dávky a následné posouzení zdravotních rizik.

Akrylamid i glycidamid se vyskytují spíše v konjugovaných formách, ale můžeme je najít

v menší míře i volně v biologických tekutinách. Obě látky mají totiž krátkou dobu výskytu v séru i plazmě, obvykle ne více než několik hodin. Proto plazmové a sérové hladiny těchto látek nejsou dobrou volbou biomarkerů expozice. Naopak volně se vyskytující akrylamid, glycidamid a glyceramid tvoří pouze malou část vyloučených látek. Hlavními metabolity akrylamidu a glycidamidu v moči jsou merkapturové kyseliny AAMA a GAMA (a iso forma). Tyto metabolity jsou pouze „krátkodobé“ biomarkery, jelikož se mohou dále měnit, proto se využívají k odhadu nedávných expozic.

Adukty akrylamidu a glycidamidu s hemoglobinem přetrvávají v těle déle než ve volných formách a v merkapturických derivátech kyselin. Jelikož je životnost erytrocytů člověka až čtyři měsíce, mohou úrovně aduktů hemoglobinu odrážet množství dávky v minulosti. To je velmi přínosné pro odhad vnitřní expozice akrylamidu a glycidamidu u lidí. Hemoglobin (Hb) je výhodnější pro sledování dávky více než DNA, a to především vzhledem k jeho dostupnosti ve velkém množství a lepší stanovitelnosti. Jako biomarkery tak lze použít akrylamid-hemoglobinový adukt AA-Hb pro hladinu akrylamidu a adukt glycidamid-hemoglobin GA-Hb jako biomarker pro interní dávku a genotoxický dopad.

V populaci USA měly nejvyšší průměrné hodnoty hladin akrylamidu děti ve věku 3-11 let a nejnižší hladiny měli dospělí nekuřáci. Vyšší hladiny u dětí byly zdůvodňovány větším příjmem jídla vztaženého na tělesnou hmotnost, a to především potravin bohatých na akrylamid jako jsou hranolky a bramborové lupínky. Na poměr AA-Hb a GA-Hb má vliv rychlost metabolismu, takže vyšší poměr byl nalezen u dětí, kdežto u dospělých nad 60 let byl průměr nízký. Frekvence příjmu potravin a údaje o jejich obsahu (především o obsahu akrylamidu) je mnohdy cennou informací při odhadu příjmu této látky. Došlo také na výzkum vlivu konzumace alkoholu na metabolismus akrylamidu. Pro cytochrom P450 3E1 je substrátem nejen akrylamid, ale také ethanol. Byl zaznamenán záporný lineární trend poměru GA-Hb a AA-Hb se zvyšujícím se příjmem alkoholu. Byl tedy prokázán konkurenční účinek mezi ethanolem a akrylamidem na cytochrom P450 2E1.

Akrylamid *in vitro* velmi pomalu reaguje s DNA, avšak jeho metabolit je až 1000x reaktivnější, díky elektrofilní epoxidové skupině. Jako markery glycidamidu, mohou být použity DNA adukty glycidamidu, N7-GA-Gua (N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin) a N3-GA-Ade (N-3-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-adenin). Tyto DNA adukty jsou přítomny v mnoha tkáních nebo orgánech a krvi hlodavců, i v lidských tkáních a krvi. Hladina DNA aduktů může být použita jako biomarker expozice akrylamidu, avšak poukazuje pouze na expozici nedávnou (do týdne). [1,2,36]

## 8. Analýza akrylamidu v potravinách

Analýza akrylamidu v tepelně ošetřených potravinách představuje součást intenzivního výzkumu. V dnešní době bylo dosaženo značného pokroku v oblasti analytických metod a byly vyvinuty četné metody stanovení akrylamidu v potravinářských výrobcích. Existuje mnoho možností, jak vzorek před analýzou upravit. Obvyklý postup úpravy vzorku začíná jeho homogenizací (vzorek je promíchán, protřepán). Může být také přidán vnitřní standard, dále je vzorek extrahován, přečištěn a analyzován příslušnou metodou. [37]

### 8.1. Odběr vzorků a homogenizace

Je zřejmé, že odběr vzorku a jeho následná příprava k analýze je zásadním krokem, který má vliv na správnost výsledků. Je proto důležité získat homogenní vzorek (například pomocí mletí). Akrylamid se tvoří převážně na povrchu pevných látek, kde je vysoká teplota a nízká vlhkost. [38]

Izolace akrylamidu z potravin je velmi zdlouhavá činnost, která může vést i ke ztrátám analytu. Z tohoto důvodu se před zahájením samotné extrakce mohou přidat vnitřní standardy pro větší přesnost výsledků. Předpokládá se, že vnitřní standard se po jeho začlenění chová stejně jako akrylamid. Široce používané vnitřní standardy pro stanovení akrylamidu zahrnují izotopem značené látky, jako je deuteriem značený  $^2\text{H}_3$ -akrylamid nebo  $\text{d}_3$ -akrylamid. Dalším typem může být také uhlíkem značený  $^{13}\text{C}_3$ -akrylamid. Mezi neizotopově značené standardy se řadí metakrylamid nebo acetamid. [38,39]

### 8.2. Izolace akrylamidu z matrice potravin

Akrylamid může být extrahován z potravinových vzorků několika možnými způsoby. Vzhledem k jeho vysoké polaritě je dobře rozpustný ve vodě a v jiných polárních organických rozpouštědlech jako je například aceton, methanol nebo ethanol. Nevýhodou extrakce pomocí vody je, že se voda poté nese snadno odstraňuje. Částečným řešením této skutečnosti je extrakce směsí vody a organického rozpouštědla, což se v současnosti běžně používá k extrakci akrylamidu z potravinové matrice. Například n-propanol má jako extrakční činidlo několik výhod ve srovnání s vodou. Mezi tyto výhody patří jeho snadné odpaření, extrahuje tuky, které mohou bránit extrakci vodou, a poskytuje čisté roztoky bez odstředění. Metanol je také velmi dobře kompatibilní s potravinovými maticemi, které obsahují velké množství škrobu a tuku, jako jsou například smažené bramborové produkty (lupínky, krokety). Kromě toho se dá také velmi snadno odpařit pod proudem dusíku. Akrylamid je naopak nerozpustný

v nepolárních rozpouštědlech jako je třeba heptan. Nízká molekulová hmotnost, nízká těkavost a vysoká rozpustnost akrylamidu přináší jistá omezení pro použití analytické metody při jeho stanovení. Ovlivnit výtěžnost extrakce může hned několik faktorů, například velikost částic vzorku, homogenizace, extrakční rozpouštědlo, poměr rozpouštědla k vzorku, teplota a doba extrakce. Na výtěžnost extrakce má mimo jiné vliv i množství tuků ve vzorku. Proto bylo zavedeno odtučňování vzorků extrakčním krokem. Tento krok může být proveden pomocí hexanu nebo cyklohexanu, avšak je zde riziko, že odstranění tuku organickým rozpouštědlem má negativní vliv právě na výtěžnost extrakce. Namísto odstranění tuku bylo zavedeno tzv. studené odstředění při 0 °C, kde tuková matrice po ztuhnutí zůstane nahoře jako vrstva, která je posléze snadno odstraněna.

Při použití jednostupňové extrakce může dojít k chybným výsledkům z důvodu neúplného vyextrahování akrylamidu. Proto byla zavedena extrakce vícestupňová, která vede ke zlepšení extrakčního výtěžku akrylamidu. Při této extrakci je nejčastěji využívána směs kyseliny mravenčí a metanolu. [38,39]

### **8.3. Čištění extraktu**

Přečištění extraktu lze provést několika možnými způsoby, jako je chemická deproteinace nebo srážení mrazem. Po těchto technikách před samotnou analýzou následuje membránová filtrace. Deproteinace je nutná u matric vzorku bohatých na bílkoviny, ty mohou být vysráženy za použití organických rozpouštědel jako je např. metanol. Prvním krokem vyčištění extraktu je čiření, a to přidáním Carrezových čiřidel. Další přečištění od interferujících látek lze provést pomocí extrakce tuhou fází (SPE, Solid Phase Extraction).

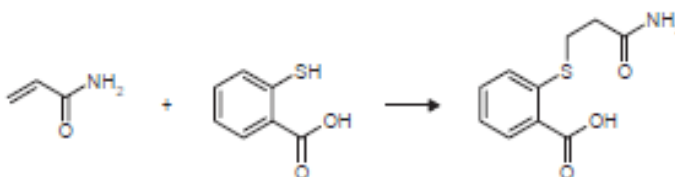
Rychlou a snadnou metodou je disperzní extrakce na tuhou fázi (dSPE). Tato metoda je založena na vzniku disperzní hmoty. V této metodě je přidáván vnitřní standard do homogenizovaného vzorku. Dalšími přísadami jsou hexan (pro odstranění tuku), voda (pro zvýšení extrakce akrylamidu), acetonitril, bezvodý síran hořečnatý a chlorid sodný (pro snížení vzájemné mísitelnosti). Aby bylo zajištěno úspěšné vyčištění extraktu, je důležité znát přibližné složení analyzovaného vzorku a z toho usuzovat na možné interference.

Další metodou je mikroextrakční technika na tuhou fázi (SPME). Výhoda této metody spočívá v tom, že vzorek pro svou přípravu nevyžaduje rozpouštědlo, vzorek je v tomto případě extrahován přímo na vlákno. Využívá se zde speciálního křemenného vlákna, které je potaženo příslušnou stacionární fází. Nejprve dochází k rozdělení analytů mezi matricí daného vzorku

a povrchem vlákna, dále dojde k desorpci extraktu z vlákna do analytického přístroje (nejčastěji GC). Jedná se tedy v podstatě o dvoustupňový proces. [38,39]

#### 8.4. Derivatizace

Pro zvýšení citlivosti odezvy je možné provést derivatizaci. Derivatizace je založena na reakci akrylamidu s kyselinou 2-merkaptobenzoovou a vznikne thioether. Tato reakce je znázorněna na následujícím obrázku. Akrylamid může být také derivatizován cysteinem. Vhodným způsobem derivatizace lze dosáhnout až 20násobného zvýšení citlivosti v systému LC-MS/MS. [39,40]

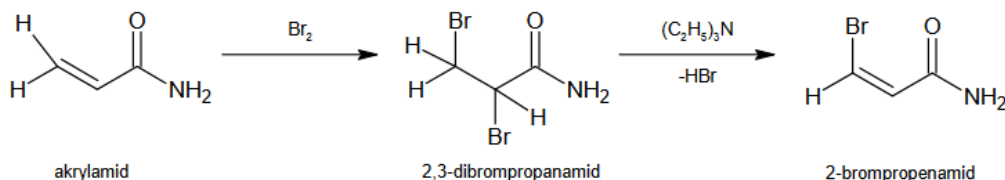


Obr.10: Derivatizace akrylamidu s kyselinou 2-merkaptobenzoovou [40]

#### 8.5. Analýza pomocí plynové chromatografie

Akrylamid je velmi často analyzován pomocí plynové chromatografie s využitím hmotnostní spektrometrie. Použitím derivatizace je dosaženo vyšší selektivity a detekční limity se sníží. Nejčastějším derivatizačním postupem pro stanovení akrylamidu pomocí plynové chromatografie je bromace (viz následující obrázek). [1]

Pro derivatizaci analytu se používá bromací směs, která obsahuje bromičnan draselný a bromid draselný. Reakce probíhá v kyselém prostředí bez přístupu světla a za teploty okolo 4 °C. Tento derivát je nestabilní a v injektoru by se mohl rozložit, proto je převeden na stabilnější formu 2-BPA (2-brompropenamid) pomocí přídavku triethylaminu. [1,39]



Obr.11: Derivatizace akrylamidu (bromace) [1]

Nejčastěji využívaným detektorem pro GC analýzu akrylamidu je hmotnostní spektrometr, pro kvantifikaci se také využívají plamenově-ionizační detektor (FID) nebo detektor elektronového záchytu (ECD).

Pokud použijeme metodu plynové chromatografie bez derivatizace analytu, s velkou pravděpodobností dojde k interferenci složek v matrici, a také nebude k dispozici dostatek charakteristických iontových píků v hmotnostním spektru akrylamidu. Použitím plynové chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií (GC-MS/MS) lze interference alespoň částečně minimalizovat a snížit tak limit detekce. [1,39]

## **8.6. Analýza pomocí kapalinové chromatografie**

Tou nejčastější metodou pro rutinní výzkumy a studie se stala kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS), zejména tedy tandemová hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS). V dnešní době má tato metoda své místo v rutinní analýze. Je vysoce citlivá a není potřeba provádět derivatizaci. Další výhodou ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií přináší pro analýzu polárních a nedostatečně těkavých látek, jelikož právě pro tyto látky je zvláště vhodná. Tandemový systém hmotnostních spektrometrů umožní separovat určené ionty od těch ostatních. Tento krok je proveden v prvním hmotnostním analyzátoru, zatímco ve druhém jsou vybrané ionty analyzovány. Pokud chceme akrylamid ve vzorku prokázat a zároveň i kvantifikovat, je pro nás tou nejvhodnější volbou UHPLC systém (Ultra High Performance Liquid Chromatography) spojený s hmotnostním spektrometrem. Jednou z nejlepších metod pro stanovení akrylamidu je kombinace UHPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS), jelikož má vysokou reprodukovatelnost, selektivitu a citlivost.

Mezi analyzátory s nízkým rozlišením řadíme například systémy s iontovou pastí, které nejsou kvůli jejich nižší přesnosti tolik využívány. Naopak analyzátory s vysokým rozlišením, jako je analyzátor doby letu (TOF), nám umožňují získat výrazně vyšší rozlišení hmotnosti akrylamidu. Co se týče způsobu ionizace, nejběžnější jsou dva, konkrétně ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). V obou případech dochází k ionizaci a fragmentaci akrylamidu. [1,39]

## **8.7. Kvantifikace akrylamidu v potravinách pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS)**

Metoda HRMS nabízí kratší dobu analýzy, snížení rušivých efektů matrice a zlepšení hmotnostní přesnosti. Dále pomocí metod DART-HRMS a LC-HRMS je možné se vyhnout extrakci před samotnou analýzou a za určitých podmínek lze vynechat i použití vnitřního standardu. To vše dohromady může představovat důležité aspekty pro převedení této metody na rutinní analýzu.

Postup analýzy lze v podstatě rozdělit do tří kroků. Příprava vzorku a čištění, přidání vnitřního standardu (s nebo bez derivatizace) a vlastní analýza. V dalším kroku dochází k detekci sloučeniny. Právě detekci lze provádět pomocí HRMS. V současnosti představuje špičku spojení strategie typu UHPLC-HRMS (ultra-účinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením) nebo DART-HRMS (přímá analýza v reálném čase ve spojení s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením). Mnohé přístroje mají nízkou rozlišovací schopnost, proto se jim molekuly s podobnými poloměry  $m/z$  překrývají. Dalším rušivým faktorem může být fakt, že mezi sebou mohou molekuly interagovat. HRMS nabízí několik výhod pro detekci malých molekul. [41]

## **8.8. DART-HRMS**

Novější technikou přímé analýzy je DART (přímá analýza v reálném čase). DART se řadí mezi desorpční iontové techniky. Pomocí DART lze analyzovat látky všech skupenství. V tomto případě je ionizující proud atomů nebo molekul helia nebo dusíku ionizuje sloučeniny na povrchu vzorku.

Pracovní postup metody DART-HRMS zahrnuje extrakci vzorků a zaznamenávání bohatého hmotnostního spektra, dle kterého lze charakterizovat chemické složení analyzovaného materiálu a zajistit tak včasnou predikci akrylamidové formace. Tyto záznamy jsou dále zpracovávány, odečte se pozadí a následně se vybírají ionty k vytvoření množiny datové matrice. Tato vybraná data se nakonec analyzují pomocí chemometrických nástrojů, které interpretují informace z naměřených dat na základě matematických modelů. [40,41]

## **8.9. Analýza akrylamidu pomocí biosenzorů**

Akrylamid jako neurotoxin a potencionální karcinogen podnítil poptávku po rychlém a přesném určení jeho obsahu v potravinách. To vyvolalo snahu o vývoj alternativních metod



pro screening. Jednoduchou, rychlou a citlivou metodou představuje analýza s použitím biosenzoru. [38,39]

### **8.9.1. Základní koncepce biosenzoru**

Biosenzor může být definován jako kompaktní zařízení určené k analytickým účelům. Cílem biosenzoru je převod biologické odezvy na zpracovatelný signál, který je úměrný koncentraci měřeného analytu. Skládá se z biologického prvku a sensorového elementu. Biologickým prvkem může být enzym, protilátka, tkáň nebo například živá buňka. Klíčovou částí senzoru je snímač, který využívá fyzikálně-chemické změny doprovázející danou reakci. Prozatím byly pro stanovení akrylamidu použity pouze dva typy biosenzorů – amperometrické a potenciometrické. Sledovanou veličinou může tedy být elektrický proud nebo potenciál. Kvantifikace akrylamidu pomocí biosenzorů vyžaduje pouze jednoduché postupy přípravy před samotným testem. [38,39]

### **8.9.2. Amperometrické akrylamidové biosenzory**

Tyto biosenzory monitorují signál generovaného proudu při výměně elektronů, a to buď přímo nebo nepřímo, mezi biologickým systémem a elektrodou. Principem akrylamidových biosenzorů je reakce hemoglobinu s akrylamidem. To vede k vytvoření aduktu Hb-akrylamid. Tento adukt mění elektroaktivitu hemoglobinu, což může vést ke snížení aktuálního vrcholu cyklického voltamogramu. Toto snížení proudu slouží jako analytický signál. Hemoglobin je v tomto případě užitečný biomarker expozice akrylamidu.

Další možností je akrylamidový biosenzor založený na interakci mezi akrylamidem a DNA, kde se používá nezačtená DNA. Používá se uhlíková skleněná elektroda (GCE), na jejíž povrch je DNA imobilizována elektroadsorpcí. Senzor vykazuje dobrou reprodukovatelnost a stabilitu. Elektrody v biosenzoru se mohou dále dělit na základě toho, zda byly použity nanomateriály či nikoliv. Akrylamidové biosenzory bez použití nanomateriálů jsou vytvořeny z uhlíkové elektrodové pasty, která je modifikovaná pomocí Hb. Obsahuje čtyři skupiny hem-Fe<sup>3+</sup>. Taková pasta podléhá redukčně-oxidačnímu procesu Hb-Fe<sup>3+</sup>/Hb-Fe<sup>2+</sup>. Akrylamid tvoří adukt s hemoglobinem. Při interakci Hb a akrylamidu dochází k poklesu proudu z důvodu redukce Hb-Fe<sup>3+</sup> na Hb-Fe<sup>2+</sup>. Tyto elektrody se ukázaly jako vhodné pro přímé stanovení akrylamidu ve vzorcích potravin.

Dalším typem akrylamidových biosenzorů jsou skleněné uhlíkaté elektrody využívající nanomateriály. Tyto elektrody jsou potaženy jednou vrstvou uhlíku a hemoglobinu. Slouží pro amperometrickou detekci ve vodných roztocích a mají velmi nízký detekční limit. [38,39]

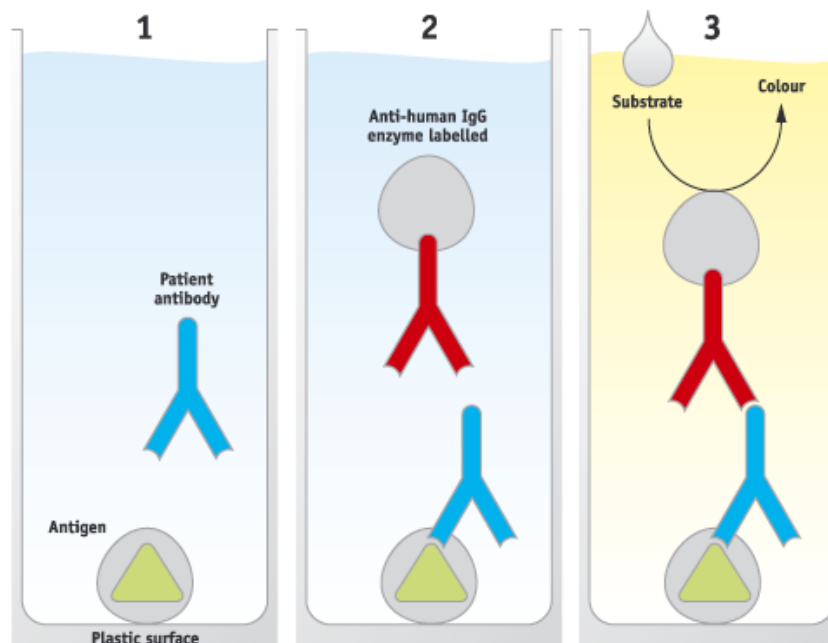
### 8.9.3. Potenciometrické akrylamidové biosenzory

Principem potenciometrického akrylamidové biosenzoru je přímá interakce mezi akrylamidem a bakteriálními buňkami. Těmito buňkami jsou bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, které vykazují intracelulární amidázovou aktivitu. Amidáza katalyzuje hydrolýzu amonného iontu ( $\text{NH}_4^+$ ), který produkuje akrylamid a odpovídající organickou kyselinu, tento iont lze detekovat pomocí selektivní elektrody. Byl vyvinut biosenzor, ve kterém jsou celé buňky imobilizovány na polymerních membránách za přítomnosti glutaraldehydu a amoniového iontu. Polymerní membrány jsou připojeny na povrch selektivní elektrodou. Povrch elektrody byl modifikován nanočásticemi zlata (AuNP), které udržují bioaktivitu buněk, a elektrochemicky snížen, což vedlo ke zvýšení rychlosti přenosu elektronů mezi buňkou a povrchem. Snímač byl prokázán jako užitečný nástroj pro měření toxicity buněk. Tato strategie byla hodnocena jako metoda okamžité a jednoduché detekce. [38,39]

### 8.10. Stanovení akrylamidu pomocí imunoenzymatických testů

V současné analýze akrylamidu stojí za zmínku imunoenzymatické testy, které stejně jako biosenzory patří mezi bioanalytické metody. Imunochemická analýza je založena na selektivní vazbě antigenů, které jsou následně kvantifikovány příslušnými protilátkami. Tyto testy se vyznačují vysokou specifitou a selektivitou. Tato skutečnost umožňuje i detekci stopových množství látek v potravinových matricích. Vedle akrylamidu se dají touto metodou detekovat i látky znečišťující potraviny jako jsou aflatoxiny, tedy mykotoxiny vytvářené rodem *Aspergillus*, vyznačující se vysokou toxicitou a prokazatelně karcinogenním účinkem. [38,39,42]

ELISA (schéma na obr. 12) je imunosorbentní test spojený s enzymem, ve kterém je identifikace analytu a jeho kvantifikace založena na imunologické reakci. Tato metoda je založena na specifické reakci antigenu a protilátky, která je selektivní pouze pro tento konkrétní antigen, reakce je značena vhodným enzymem. Protilátky jsou z chemického hlediska globulárními proteiny zvané imunoglobuliny. Imunoglobuliny jsou vytvářeny imunitním systémem v reakci na příslušné antigeny. [38,39]



Obr.12: Schéma metody přímá ELISA [43]

Protilátka se selektivně váže na organické sloučeniny spojené s proteinovými molekulami, které samotnou produkci protilátek vyvolaly. Princip kvantifikace spočívá ve stanovení rozdílu koncentrace zbytkových (tedy nevázaných) protilátek. Z tohoto důvodu se využívá indikátor protilátky, který usnadňuje detekci a neruší stanovení analytu. Využívá se tzv. značení, jehož příkladem je spojení protilátky s biotinem. Obvykle je aktivita enzymu stanovena na základě měření absorbance po převedení substrátu na barevný produkt. Detekci akrylamidu komplikuje fakt, že akrylamid je látka nízkomolekulární a není tedy imunogenní, nedokáže tedy vyvolat syntézu protilátek. Pro tento účel se začaly využívat polyklonální protilátky, které umožňují kvantitativní stanovení. Vazbou akrylamidu na imuno-stimulující nosné proteiny dojde k účinné stimulaci syntézy protilátek. Samotná kvantifikace akrylamidu metodou ELISA je založena na reakci antigenu, kterým je derivát akrylamidu navázaný na sérový lidský albumin (Ade-3-MBA-HSA) s jeho protilátkou. Detekce proběhne po reakci s další specifickou protilátkou, která je spojena s HPR (křenovou peroxidázou). Reakce je katalyzovaná enzymem a ten poskytne barevný produkt, u kterého je měřena hodnota absorbance pro vlnovou délku 450 nm. [38,39]

### **8.11. Obsah akrylamidu v potravinách: predikce a kvantifikace**

Kvalita potravin je kromě celé řady faktorů ovlivňována i množstvím akrylamidu. Každý tepelný proces zahrnující reakci redukujících cukrů a asparaginu při nízké vlhkosti musí být zvážen jako potenciální riziko vzniku akrylamidu. Predikce jeho tvorby za použití například kinetického modelování může přispět k objasnění jeho reakčních mechanismů a následně jeho tvorby a interakce s biologickými molekulami v lidském těle. Přímé prediktivní metody napomáhají odhalit skutečný obsah akrylamidu v různých potravinách. [41]

## Závěr

Práce podává souhrnné informace o akrylamidu. Nejprve jsou popsány jeho fyzikální a chemické vlastnosti a dále jsou uvedeny potraviny, ve kterých se akrylamid vyskytuje nejvíce. Konkrétně jsou popsány smažené bramborové výrobky, pekařské výrobky, káva a její náhražky, a další komodity jako jsou olivy a ořechy. Také je popsána problematika výskytu akrylamidu v povrchové a pitné vodě.

Jsou popsány světové trendy ve výskytu této látky, především se zaměřením na vybrané potraviny. Je popsán tzv. „Acrylamide Toolbox“, který pomáhá výrobcům potravin k identifikaci nejlepších způsobů, jak snížit obsah akrylamidu v jejich produktech.

Další část práce pojednává o mechanismech tvorby akrylamidu. K jeho vzniku mohou vést hlavní cesty přes produkt 3-aminopropanamid. Peptidy nesoucí alanin mohou mít také vliv na vznik akrylamidu a jsou tak součástí cest minoritních.

Dále je popsán účinek akrylamidu na zvířata, lidi i potomstvo. Akrylamid byl prokázán nejen jako multiorganický karcinogen u hlodavců, ale byl také zařazen do skupiny potenciálních lidských karcinogenů. Studie na zvířatech prokázaly negativní dopad na vývoj CNS a rozmnožovací soustavy potomků.

Práce také pojednává o metabolismu akrylamidu v lidském těle, tedy o jeho biotransformaci. In vivo je akrylamid prostřednictvím cytochromu P450 2E1 částečně převeden na epoxidový glycidamid, který je genotoxický a interaguje s DNA. Jako biomarkery expozice akrylamidu mohou sloužit merkapturové kyseliny a mohou tak vést k odhalení možných zdravotních rizik.

Poslední kapitola je věnována analýze akrylamidu. Je popsán postup při odběru vzorků, izolace akrylamidu z matrice potravin, přečištění extraktů a derivatizace. Akrylamid je často analyzován pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, avšak tou nejčastější metodou pro rutinní výzkumy a studie se stala kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií, zejména tedy tandemová hmotnostní spektrometrie. Další metodou je kvantifikace akrylamidu v potravinách pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS), která nabízí kratší dobu analýzy, snížení rušivých efektů matrice a zlepšení hmotnostní přesnosti, to vše dohromady může představovat důležité aspekty pro převedení této metody na rutinní analýzu. Poměrně novou technikou přímé analýzy je DART (přímá analýza v reálném čase), kterou lze využít na analýzu látek všech skupenství. Jednoduchou, rychlou a citlivou metodou je bioanalytická metoda za použití biosenzoru. Další alternativní metodou

pro screening akrylamidu v potravinách jsou imunoenzymatické testy, které jsou založeny na selektivní vazbě antigenů. Antigeny jsou následně kvantifikovány příslušnými protilátkami. Tyto testy se vyznačují vysokou specifitou a selektivitou, to umožňuje detekci stopových množství látek v potravinových matricích.

Jelikož jsou dodnes některé části biotransformace akrylamidu záhadou, bylo by vhodné vyvinout nové postupy sledování jeho metabolismu. Velké riziko vidím právě v karcinogenitě, a proto by měl být kladem větší důraz na kontrolní postupy a monitoring během úprav potravin a vody.

## Zdroje

- [1] PAPOUŠEK, R. *Analýza akrylamidu metodou GC/MS: Diplomová práce*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2012.
- [2] CWIKOVÁ, O. Toxické účinky akrylamidu a jeho výskyt v potravinách. *Chem. Listy* [online]. 2014 [cited 2019-03-01], p. 205–210. Available from [http://chemicke-listy.cz/docs/full/2014\\_03\\_205-210.pdf](http://chemicke-listy.cz/docs/full/2014_03_205-210.pdf).
- [3] MESIAS, M., MORALES, F. J. Acrylamide in Bakery Products, kapitola v knize *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*. 2015. ISBN 0128028750.
- [4] FOODDRINKEUROPE FoodDrinkEurope updates industry-wide Toolbox to help manufacturers further mitigate Acrylamide. *FoodDrinkEurope* [online]. 2011 [cited 2019-02-01]. Available from <https://www.fooddrinkeurope.eu/news/press-release/fooddrinkeurope-updates-industry-wide-toolbox-to-help-manufacturers-further/>.
- [5] LINEBACK, David R.; COUGHLIN, James R.; STADLER, Richard H. Acrylamide in foods: a review of the science and future considerations. *Annual review of food science and technology*, 2012, 3: 15-35.
- [6] MOJSKA, H. Secular Trends in Food Acrylamide, kapitola v knize *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*. 2015. ISBN 0128028750.
- [7] WENZL, Thomas; ANKLAM, Elke. European Union database of acrylamide levels in food: update and critical review of data collection. *Food additives and contaminants*, 2007, 24.sup1: 5-12.
- [8] EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA* [online]. 2012 [cited 2019-02-01]. Available from <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2012.2938>.
- [9] POWERS, Stephen J., et al. Acrylamide concentrations in potato crisps in Europe from 2002 to 2011. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2013, 30.9: 1493-1500.
- [10] ZYZAK, David V., et al. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2003, 51.16: 4782-4787.

- [11] SNELSON, M., COUGHLAN, M. T. Dietary Advanced Glycation End Products: Digestion, Metabolism and Modulation of Gut Microbial Ecology. *Nutrients* [online]. 2019, vol. 11, no. 2 [cited 2019-02-01]. Available from <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/2/215/htm>
- [12] GÖKMEN, V., PALAZOĞLU, T., K., SSENJUVA, H. Z. Relation between the acrylamide formation and time–temperature history of surface and core regions of French fries. *J. Food Eng.* [online]. 2006 [cited 2019-03-01], p. 972–976. Available from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.603.8374&rep=rep1&type=pdf>.
- [13] NOOSHKAM, M., VARIDI, M., BASHASH, M. The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food Chem.* [online]. 2019 [cited 2019-03-01], p. 644–660. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618316546#s0160>.
- [14] VAROUJAN, A. Y., STADLER, R. H. Acrylamide Formation in Food: A Mechanistic Perspective. *J. AOAC Int.* [online]. 2005 [cited 2019-03-01], p. 262–267. Available from [https://www.researchgate.net/profile/Varoujan\\_Yaylayan/publication/7974190\\_Acrylamide\\_formation\\_in\\_food\\_A\\_mechanistic\\_perspective/links/0912f507e9843d1f4900000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Varoujan_Yaylayan/publication/7974190_Acrylamide_formation_in_food_A_mechanistic_perspective/links/0912f507e9843d1f4900000.pdf)
- [15] STADLER, R. H., STUDER, A. Acrylamide Formation Mechanisms, kapitola v *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*. 2015. ISBN 0128028750.
- [16] CLAUS, Achim, et al. Pyrolytic acrylamide formation from purified wheat gluten and gluten-supplemented wheat bread rolls. *Molecular nutrition & food research*, 2006, 50.1: 87-93.
- [17] FRIEDMAN, Mendel. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2003, 51.16: 4504-4526.
- [18] BULL, Richard J., et al. Carcinogenic effects of acrylamide in Sencar and A/J mice. *Cancer Research*, 1984, 44.1: 107-111.



- [19] FENNELL, Timothy R., et al. Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicological Sciences*, 2004, 85.1: 447-459.
- [20] YANG, Hye-Jin, et al. Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile. *Reproductive toxicology*, 2005, 19.4: 527-534.
- [21] KO, Miao-Hwa; CHEN, Wen-Pin; HSIEH, Sung-Tsang. Neuropathology of skin denervation in acrylamide-induced neuropathy. *Neurobiology of disease*, 2002, 11.1: 155-165.
- [22] RICE, Jerry M. The carcinogenicity of acrylamide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2005, 580.1-2: 3-20.
- [23] DEARFIELD, Kerry L., et al. Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1995, 330.1-2: 71-99.
- [24] SUMNER, Susan CJ, et al. Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chemical research in toxicology*, 1999, 12.11: 1110-1116.
- [25] GARCIA, Erika, et al. Hazardous air pollutants and breast cancer risk in California teachers: a cohort study. *Environmental Health*, 2015, 14.1: 14.
- [26] OBON-SANTACANA, M., et al. Dietary intake of acrylamide and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Annals of oncology*, 2013, 24.10: 2645-2651.
- [27] HOOD, R. D. kapitola třetí v knize *Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach*. 3rd ed. 2016. ISBN 1841848212.
- [28] HOOD, R. D. kapitola čtvrtá v knize *Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach*. 3rd ed. 2016. ISBN 1841848212.
- [29] HUŁAS-STASIAK, M., DOBROWOLSKI, P., TOMASZEWSKA, E. Maternal Acrylamide and Effects on Offspring, kapitola v knize *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*. 2015. ISBN 0128028750.

- [30] MARTIN, Roy P.; DOMBROWSKI, Stefan C. *Prenatal exposures: Psychological and educational consequences for children*. Springer Science & Business Media, 2008. ISBN 0387743987.
- [31] ALLAM, A., et al. Prenatal and perinatal acrylamide disrupts the development of cerebellum in rat: biochemical and morphological studies. *Toxicology and Industrial Health*, 2011, 27.4: 291-306.
- [32] ALLAM, A., et al. Effect of acrylamide on the development of medulla oblongata in albino rat: biochemical and morphological studies. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2013, 7.20: 1320-1331.
- [33] TYLA, Rochelle W., et al. Rat two-generation reproduction and dominant lethal study of acrylamide in drinking water. *Reproductive Toxicology*, 2000, 14.5: 385-401.
- [34] SEGA, Gary A., et al. Acrylamide exposure induces a delayed unscheduled DNA synthesis in germ cells of male mice that is correlated with the temporal pattern of adduct formation in testis DNA. *Environmental and molecular mutagenesis*, 1990, 16.3: 137-142.
- [35] FRIEDMAN, Marvin A., et al. Effects of lactational administration of acrylamide on rat dams and offspring. *Reproductive Toxicology*, 1999, 13.6: 511-520.
- [36] KOCADAĞLI, T., GÖKMEN, V. Metabolism of Acrylamide in Humans and Biomarkers of Exposure to Acrylamide, kapitola v knize *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*. 2015. ISBN 0128028750.
- [37] GÖKMEN, V. Analysis of Acrylamide in Foods with Special Emphasis on Sample Preparation and Gas Chromatography– Mass Spectrometry Detection, kapitola v knize *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*. 2015. ISBN 0128028750.
- [38] BATRA, B., PUNDIR, Ch. S. Detection of Acrylamide by Biosensors, kapitola v knize *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*. 2015. ISBN 0128028750.
- [39] ORACZ, Joanna; NEBESNY, Ewa; ŻYŻELEWICZ, Dorota. New trends in quantification of acrylamide in food products. *Talanta*, 2011, 86: 23-34.

- [40] CREWS, C. Liquid Chromatographic Tandem Mass Spectrometry to Determine Acrylamide in Foods, kapitola v knize *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*. 2015. ISBN 0128028750.
- [41] TROISE, A. D., FOGLIANO, V. *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*. 2015. ISBN 0128028750.
- [42] Aflatoxins. *J. Natl. Cancer Inst.* [online]. 2018 [cited 2019-04-01]. Available from <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/substances/aflatoxins> .
- [43] Direct ELISA. *SVAR WIESLAB* [online]. [cited 2019-05-04]. Available from <http://www.wieslab.com/diagnostic-services/index.php?headId=72&pageId=124&subId=92>